

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurochirurgie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. H. W. Pia  
am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN AUTO-  
RADIOGRAPHIE DES  $^{14}\text{C}$ -D-GLUKOSE-STOFF-  
WECHSELS VON NORMALEM UND TRAUMATISIERTEM  
RATTENHIRN MIT HILFE DER MIKRO-  
ABSORPTIONS – PHOTOMETRIE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

STEPHAN BONORDEN  
aus Marburg an der Lahn

---

Gießen 1980

---







Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurochirurgie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. H. W. Pia  
am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN AUTO-  
RADIOGRAPHIE DES  $^{14}\text{C}$ -D-GLUKOSE-STOFF-  
WECHSELS VON NORMALEM UND TRAUMATISIERTEM  
RATTENHIRN MIT HILFE DER MIKRO-  
ABSORPTIONS – PHOTOMETRIE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

STEPHAN BONORDEN  
aus Marburg an der Lahn

---

Gießen 1980

Dekan: Prof. Dr. Ringleb

Betreuer der Arbeit: Dr. W. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. H. W. Pia

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Dorndorf



Die vorliegende Dissertationsschrift wurde in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Gießen angefertigt.

Beginn: Oktober 1974

Herrn Prof. Dr. W. Wesemann danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine Ratschläge.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biophysik danke ich für die technische Unterstützung; im besonderen gilt mein Dank Herrn Dr. G. Seibold für die Hilfestellung bei der Durchführung der mikro-absorptions-photometrischen Messungen.

Den Mitarbeitern des Liquor-Labors der Neurochirurgischen Universitätsklinik danke ich herzlich für Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41552623\\_0088](https://archive.org/details/IA41552623_0088)

VERZEICHNIS DER ÜBERSCHRIFTEN

- Seite -

|      |                                                                                                                                         |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.   | <u>Einführung in die Fragestellung.</u>                                                                                                 | 1  |
| II.  | <u>Methoden und Material.</u>                                                                                                           | 7  |
| 1)   | Grundlagen und methodische Voruntersuchungen zur Traumatisation des Hirngewebes.                                                        | 7  |
| 2)   | Grundlagen über den Glukosebedarf des Hirngewebes.                                                                                      | 10 |
| 3)   | Methodische Voruntersuchung zur $^{14}\text{C}$ -D-Glukoseverteilung im Organismus nach i.v. Injektion oder Applikation per Magensonde. | 11 |
| 4)   | Grundlagen der Autoradiographie.                                                                                                        | 22 |
| 5)   | Methodik der Autoradiogramm-Herstellung.                                                                                                | 29 |
| 6)   | Grundlagen der Densitometrie.                                                                                                           | 32 |
| 7)   | Versuchsanordnung und -durchführung.                                                                                                    | 37 |
| 7.1) | Versuchstiere.                                                                                                                          | 37 |
| 7.2) | Versuchsanordnung.                                                                                                                      | 38 |
| 8)   | Statistik.                                                                                                                              | 42 |

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III. | <u>Ergebnisse.</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 43  |
| 1)   | Darstellung der meßtechnischen Grenzbereiche der Mikro-Absorptionsphotometrie.                                                                                                                                                                                                                                                    | 43  |
| 2)   | Autoradiographie von Standardpräparaten bekannter spezifischer Aktivität. Berechnung der mittleren optischen Dichte (Optical Density, $\overline{O.D.}$ ) und Korrelation von spezifischer Aktivität, Expositionszeit und $\overline{O.D.}$ .                                                                                     | 58  |
| 3)   | Autoradiographie von histologischen Präparaten des Rattenhirnes unbekannter spezifischer $^{14}\text{C}$ -Aktivität; Berechnung der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) für Rinde und Mark.                                                                                                                                | 71  |
| 4)   | Bestimmung der spezifischen $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe.                                                                                                                                                                                                                                                             | 79  |
| 5)   | Mikro-absorptionsphotometrische Bestimmung der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Autoradiogramm unterschiedlicher Spezifikationen.<br>Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu Schnittdicke, Expositionszeit und Gesamtaktivität an $^{14}\text{C}$ -D-Glukose, die den Tieren appliziert wurde. | 90  |
| 6)   | Bestimmung der spezifischen $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe und ihre Standardisierung.                                                                                                                                                                                                                                   | 110 |

|       |                                                                                                                                                        |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7)    | Vergleich der mittleren Extinktionen<br>( <u>O.D.</u> ) in Autoradiogrammen von Hirn-<br>schnitten traumatisierter und nicht<br>traumatisierter Tiere. | 120 |
| IV.   | <u>Diskussion.</u>                                                                                                                                     | 132 |
| V.    | <u>Zusammenfassung.</u>                                                                                                                                | 151 |
| VI.   | <u>Literaturverzeichnis.</u>                                                                                                                           | 153 |
| VII.  | <u>Verzeichnis der Tabellen und<br/>Abbildungen.</u>                                                                                                   | 186 |
| VIII. | <u>Tabellarischer Lebenslauf.</u>                                                                                                                      | 196 |



## I. EINFÜHRUNG IN DIE FRAGESTELLUNG.

Die Therapie des Hirnödems ist trotz wesentlicher Teilerfolge ein ungelöstes Problem. Die klinische Forschung ist daher nach wie vor intensiv auf die Ermittlung eines möglichst allgemeingültigen und wirksamen Behandlungsprinzips gerichtet, weil mit der Überwindung der Ödemphase oder der Vermeidung der Ödementwicklung eine der wesentlichen Voraussetzungen zur maximal erreichbaren Restitution bei zerebralen Krankheitsprozessen geschaffen wäre (23;40;44;47;81;126;130;137). Die Erreichung dieses Forschungszieles ist dadurch erheblich erschwert, weil objektivierende Kriterien für die Beurteilung der Effektivität der Behandlung nicht in gewünschtem Maße zur Verfügung stehen, und weil die Pathogenese des Hirnödems sehr differente therapeutische Ansätze bietet. Die Ödembildung ist einerseits eine gravierende Komplikation im Krankheitsverlauf und kann Ursache für Folgeerkrankungen sein, die einen deletären Ablauf bewirken können; andererseits ist die Ödembildung nur ein Begleitphänomen bei infektiösen, tumurösen, degenerativen und toxischen Hirnerkrankungen - d.h. die Ödembildung ist ein Teilproblem der therapeutischen Beeinflußbarkeit des primären Krankheitsgeschehens. Zwischen der Beseitigung des Begleitsymptoms und der Bekämpfung der Ursache liegt und lag mit wechselnden Schwerpunkten der Bereich der therapeutischen Maßnahmen (20;44;45;51;52;66;99;105). Die Effektivität des Behandlungsmodus ist im Einzelfall jeweils nur ungenau zu beurteilen, weil die Symptomatologie des Hirnödems aufgrund des multifaktoriellen Ursprungs uneinheitlich ist und daher keine Skalierung erlaubt.

Das klinische Erscheinungsbild imponiert auf der einen Seite in einer Funktionseinbuße des erkrankten Hirnareals selbst, auf der anderen Seite fallen die Sekundärfolgen der Volumenzunahme des Hirngewebes und die daraus resultierende intrakranielle Drucksteigerung in entscheidender Weise ins Gewicht. Der Druck als vektorielle Größe hat sowohl eine gerichtete Fernwirkung auf morphologische Funktionseinheiten als auch eine generelle Auswirkung auf die Hirnleistung. Es konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein eines Symptoms (z.B. einer Stauungspapille oder eines sogenannten "Druckpulses") für die Existenz eines Hirnödems beweisend sein kann, daß andererseits aber die Abschwächung des gleichen Symptoms nicht nur den Rückschluß auf eine Reduzierung des Ödems erlaubt, sondern auch Hinweis auf die Überlagerung des Symptoms durch klinisch gravierendere zerebrale Funktionsausfälle sein kann. Die Schwierigkeit und die Unsicherheit, Ausmaß und direkt kausale Auswirkungen eines ödematisierten Hirnareals klinisch zu erfassen, führten dazu, daß für jeden der angewandten Behandlungsmodi befürwortende und ablehnende Stellungnahmen abgegeben werden konnten - je nachdem, welche Beurteilungskriterien zugrundegelegt wurden. Weder die sogenannte "Osmotherapie" des Hirnödems, die sich als vorwiegend symptomatische Maßnahme die Regulierung eines entgleisten Wasser- und Elektrolythaushaltes zum Ziel macht, hat einen eindeutigen Effekt gezeigt, noch die Verbesserung des zerebralen Sauerstoffangebotes, z.B. durch Stabilisierung der Kreislauf- und Atemfunktion, durch hyperbare Oxidation oder durch Hypothermie und tiefe Sedierung (15;20;23;40;44;45;47;49;51;56;81;99;126;130;137). Die anfängliche Euphorie bei Einsatz von Nebennierenrindenhormonen in unterschiedlicher

Dosierung hat sich ebenfalls nicht halten können (8;9; 17;23;36;40;41;44;50;51;94;98;108;110;111;112;113;118; 121;123;124;130;137;147;154;155;157;158;176;184;185; 186; 187; 189). Angesichts der differierenden Standpunkte in der Literatur muß natürlich berücksichtigt werden, daß negative Behandlungsergebnisse auch durch die erwähnten Schwierigkeiten in der Beurteilung der Ödementwicklung bzw. Ödemrückbildung vorgetäuscht werden können. Letztlich mag ein ausbleibender Behandlungserfolg auch darauf zurückzuführen sein, daß die Behandlungsebene noch nicht der Schädigungsebene entspricht.

Für die objektive Beurteilung der Kinetik des Hirnödems gibt es zur Zeit keine geeignete Methode. Ein allgemeingültiger Indikator für einen therapeutischen Erfolg würde aber erlauben, eine sinnreiche Ordnung in die zur Zeit vielschichtigen Behandlungskonzepte zu bringen und die gezielte Suche nach effektiveren Medikamenten zu ermöglichen bzw. zu erleichtern.

Auf der Suche nach hilfreichen Aufschlüssen in der Pathogenese des Hirnödems teilen viele Autoren die Überzeugung, daß alle bisher bekannten pathophysiologischen Mechanismen und morphologischen sowie klinisch chemischen Befunde beim Hirnödem letztlich mit Erscheinungen eines zerebralen Energiemangels in Zusammenhang zu bringen sind (24;25;61;104;130;144;145;146). Basierend auf dieser Tatsache und der eindeutigen Abhängigkeit des Hirngewebstoffwechsels von dem Substrat Glukose (119;138;139;182) läßt sich ein System entwickeln, das die objektive Beurteilung des Therapieeffektes ermöglichen könnte.

Wenn zugrundegelegt wird, daß eine gesteigerte hirnorganische Leistung mit einem erhöhten Glukoseumsatz verbunden ist (144;159), dann müßte entsprechend eine Leistungsminderung durch einen gegenüber der Norm gesenkten Glukoseumsatz gekennzeichnet sein. Die Einschleusung von radioaktiv markierter Glukose als Tracer für den zerebralen Stoffwechselprozeß müßte bei einer autoradiographischen Untersuchungstechnik die Bereiche mit gesteigertem Glukoseumsatz deutlicher geschwärzt zur Darstellung bringen als die mit geringerem Umsatz. Die meßbare Normalisierung einer pathologisch erhöhten oder erniedrigten Glukoseumsatzrate durch therapeutische Maßnahmen wäre dann - als Ausdruck einer wiedergewonnenen normalen Zellaktivität - beweisend für die Effektivität der Medikation.

Durch einen Modellversuch konnte WESEMANN nachweisen, daß im traumatisierten und ödematisierten Hirngewebe eine verminderte <sup>14</sup>C-D-Glukoseeinlagerung erfolgt. Autoradiographisch war im Bereich einer experimentell erzeugten Koagulationsnekrose Radioaktivität nur in Spuren nachweisbar. In einer die Nekrose konzentrisch umgebenden Zone verminderter Schwärzungsdichte - die dem perifokalen Ödem entsprechen könnte - , kamen unterschiedliche Grautöne zur Darstellung, die sich peripher vom Koagulationszentrum kontinuierlich zu einem Schwärzungsgrad verdichteten, wie er für nichttraumatisiertes Gewebe typisch ist. Eine Quantifizierung und damit die Korrelation der autoradiographisch erzeugten Grautöne zur spezifischen gewebsinkorporierten <sup>14</sup>C-Aktivität würde tierexperimentell die Voraussetzung schaffen, einfach und schnell verbindliche Aussagen über die Effektivität therapeutischer Maßnahmen

machen zu können. Wirksame Medikamente oder Maßnahmen müssen die Stoffwechselaktivität der Zellen in der "Grauzone" beeinflussen. Eine Steigerung des Glukoseumsatzes dieses pathobiotischen Bereiches würde dann über eine verstärkte  $^{14}\text{C}$ -Einlagerung zu einer Intensivierung der autoradiographischen Schwärzung führen und in dem Ausmaß, in dem die Zelltätigkeit normalisiert wäre, eine Verschmälerung der Übergangszone herbeiführen.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Grundlagen für eine Quantifizierung der in der Autoradiographie erzeugten Schwärzungsgrade zu erarbeiten. Es wird also dargestellt werden müssen, ob die lokale Glukoseumsatzrate quantitativ korreliert werden kann mit

- dem Schwärzungsgrad der photoempfindlichen Folie
- der Expositionsdauer des Hirnpräparates
- der Menge an gewebssinkorporierter  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose.

Für die Bearbeitung dieser Fragen war von grundlegender Bedeutung, daß tierexperimentell vergleich- und wiederholbare Stoffwechselsituationen erzeugt werden konnten. Weiterhin war eine gesicherte gleichmäßige Verteilung der applizierten  $^{14}\text{C}$ -D-Glukosemenge ebenso bedeutsam wie die adäquate Aufbereitung des Gewebes für die Autoradiographie. Schließlich mußte eine geeignete Meßeinrichtung für die kontinuierliche Darstellung der Schwärzungsdichte mikroskopischer Bildteile gefunden und der speziellen Problemstellung angepaßt werden.

An vielen Teilprojekten zur Klärung dieser für die vorliegende Fragestellung eminent wichtigen Voraussetzungen wurde im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen aktiv mitgearbeitet; zum Teil wurden auch abgeschlossene Verfahrenstechniken übernommen.

## II. METHODEN UND MATERIAL.

### II.1) Grundlagen und methodische Voruntersuchungen zur Traumatisation des Hirngewebes.

Serienuntersuchungen mit dem Ziel, die Stoffwechselaktivität von traumatisiertem und gesundem Hirngewebe miteinander zu vergleichen, sind an folgende Voraussetzungen gebunden:

Die Traumatisierung muß in gleicher Intensität und in gleichem Ausmaß an gleicher Stelle des Hirngewebes erfolgen. Dabei muß in engen Grenzen Zeitgleichheit des Vorganges bei mehreren Tieren gewahrt sein, damit Vergleichsuntersuchungen für statistische Zwecke einen konkreten Bezug erhalten. Bei der Vielzahl von Traumamodellen, die tierexperimentell zur Erforschung des Hirnödems entwickelt wurden, und die in ihrer Art nur zum geringen Teil klinisch relevant sind, werden diese Forderungen nicht erfüllt (1;9;56;62;79;84;95;96;103;104;117;129;146;173;174;175;187). Dies gilt in besonderer Weise für die Forderung nach gleichem Ausmaß und Zeitgleichheit. Es war daher notwendig, ein neues Modell zu entwickeln - oder aber ein bekanntes an diese Forderungen zu adaptieren.

Das Prinzip, das im Traumamodell nach WESEMANN (persönliche Mitteilung) verwirklicht wurde, erfüllt zwar nicht die Forderung nach klinischer Relevanz, bietet dafür aber die Möglichkeit, Ödeme in gleichem Ausmaß und bei verschiedenen Tieren zeitgleich zu induzieren.

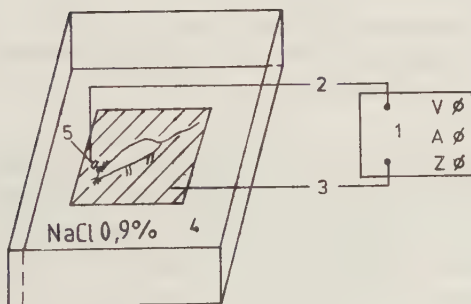
Es wird eine Koagulationsnekrose durch die Einwirkung des elektrischen Stromes auf das Hirngewebe erzeugt. Eine identische und jederzeit reproduzierbare Lokalisation dieser Nekrosen erreicht man durch entsprechende Platzierung einer leitenden Nadelelektrode, die jeweils an definierter Stelle durch die Kalotte ins Hirngewebe eingebracht wird. Die Elektrode wird durch ein Plastikscheibchen von 1 cm Ø gegen die Kalotte isoliert, so daß der Stromaustritt allein an der Nadelspitze erfolgt (bzw. die Gewebsläsion durch eine quantitativ gleiche Erwärmung längs des Nadelkörpers im Hirngewebe stattfindet) und nicht vorzeitig durch die Galea abgeleitet wird. Als Stromgeber dient ein Gerät, das so ausgelegt ist, daß der Stromfluß durch eine kontinuierliche Steuerung der angelegten Spannung geregelt werden kann. Die verwendete Strommenge ist durch eine vorprogrammierte Zeitwahl reproduzierbar.

Durch die Serienuntersuchungen konnte ermittelt werden, daß eine ausreichende Koagulationsnekrose des Hirngewebes mit entsprechender Ödemausbreitung durch einen Stromfluß von 50 mA, 75 mV und 20 Sekunden Dauer erzielt wird.

Abbildung 1 :     Schematischer Aufbau der Traumatisierungsvorrichtung.

Es bedeuten:

- 1 = Spannungsteil mit variabel einstellbarer Spannung (Volt) und Zeitschaltuhr (Z).
- 2 = Nadelelektrode.
- 3 = Gegenelektrode in Plattenausführung.
- 4 = Kunststoffschale mit leitender Flüssigkeit (physiol. NaCl) zur Aufnahme des Versuchstieres während der Traumatisierung.
- 5 = Isolierendes Kunststoffscheibchen (Teflon).



## II.2) Grundlagen über den Glukosebedarf des Hirngewebes.

Unter normalen Ernährungs- und Versorgungsbedingungen wird der Erhaltungs- und Leistungsstoffwechsel des Hirngewebes ausschließlich durch Glukoseverbrauch gedeckt (88;89;90;91;92;116;138;139;159). Im Hungerzustand können nach einer Adaptionszeit von 2-3 Tagen (88;159) auch Ketonkörper zur Energiebedarfsdeckung herangezogen werden. Mittelwerte für den zerebralen Glukoseverbrauch werden in der Literatur (46;72;73) mit 10 mg/100 ml Blut angegeben; das entspricht bei einer Durchblutungsgröße von 50 - 55 ml/100 g Gewebe/Min. (159) einem Tagesbedarf von ca. 110-120 g. Da unter Normalbedingungen ca. 200 g Glukose/24 h von der Leber an das Blut abgegeben werden, errechnet sich der Anteil für das Hirngewebe daraus mit ca. 60% (159).

Die Glukoseaufnahme in das Hirngewebe erfolgt - wie bei den Erythrozyten und dem lymphatischen Gewebe - insulinunabhängig (6;10;78;125).

Diese Tatsache ist insofern von besonderer Bedeutung, als sie verdeutlicht, daß die Deckung des hohen Eigenbedarfs des Hirngewebes an Glukose regulatorisch auf verschiedenen Wegen erreicht werden kann. Auf der einen Seite besteht die Möglichkeit einer gesteigerten Glukosefreisetzung durch Leber und Nieren; auf der anderen Seite ist die Möglichkeit gegeben, die übrigen Organe von der Glukoseversorgung regulatorisch auszuschließen, und zwar durch eine Minderung oder Aufhebung der Insulinaktivität (RANDEL-Zyklus).

Die Glukoseaufnahme in die Hirnzellen erfolgt durch ein stereospezifisches Transportsystem (6;10;78;125) und ist nicht reversibel, d.h. eine Rückverteilung der Glukose aus dem Hirngewebe in das Blut ist nicht möglich, weil während der Transportvorgänge eine Phosphorylierung der Glukose stattfindet. Dieser Schritt wiederum kann nur von einem Enzym rückgängig gemacht werden (Glukose-6-Phosphat-Phosphatase), dessen Aktivität im Säugerhirn nach Aussage mehrerer Autoren verschwindend gering ist (67;68;69;133).

Diese eindeutige Abhängigkeit des Hirngewebsstoffwechsels von der Glukose schafft für die Bestimmung der Stoffwechselrate andere und sehr viel einfachere Voraussetzungen, als wenn für den Energieumsatz ein Gemisch von Kohlenhydrat, Fett und Eiweiß mit wechselnden prozentualen Anteilen erforderlich wäre.

#### II.5) Methodische Voruntersuchung zur $^{14}\text{C}$ -D-Glukoseverteilung im Organismus nach i.v. Injektion oder Applikation per Magensonde.

Die Möglichkeit, den Glukoseumsatz des Hirngewebes durch Messung der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität qualitativ und begrenzt auch quantitativ zu erfassen, ist an folgende Voraussetzungen gebunden:

- 1.- Die Halbwertszeit des verwendeten Radioisotops muß der Versuchsart und -dauer angepaßt werden, d.h. es dürfen während des experimentellen Vorgehens keine oder aber genau kalkulierbare Verluste an Radioaktivität eintreten.
- 2.- Die  $^{14}\text{C}$ -markierten Glukosemoleküle müssen die gleichen Stoffwechselwege in gleicher Art durchlaufen wie nicht markierte Glukosemoleküle.
- 3.- Nach der Applikation muß eine gleichmäßige Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose im Organismus vorliegen.
- 4.- Innerhalb eines bestimmten Zeitraumes muß bei gleichbleibender Applikationsweise ein gleichbleibender Prozentsatz der markierten Glukose gegenüber den nicht markierten Molekülen metabolisiert werden.

Für vergleichende Untersuchungen mußte gesichert sein, daß innerhalb eines Zeitintervalles sowohl die Metabolisierungsrate als auch die Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose im Organismus in engen Grenzen gleich bleibt.

Für den Nachweis einer unter den gleichen Bedingungen gleichmäßigen Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose im Organismus mußte dargestellt werden, welche Ausscheidungskinetik die Stoffwechselendprodukte der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukosemetabolisierung haben. Zum anderen galt es festzustellen, welche quantitative Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose im Organismus dieser Ausscheidungskinetik zuzuordnen ist.

Zur Bestimmung der Metabolisierungsrate der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose wurde quantitativ die Menge des Stoffwechselendproduktes  $^{14}\text{CO}_2$  erfaßt. Dieses Ziel wurde über eine kontinuierliche Messung der  $\text{CO}_2$  und  $^{14}\text{CO}_2$ -Konzentrationen in der Ausatemungsluft der Versuchstiere erreicht. Die Meßperioden wurden bis zu einer Maximallänge von elf Stunden gestreckt.

200 - 250 g schwere Ratten wurden in einem zylinderförmigen, allseits geschlossenen Gefäß von einer definierten Menge Frischluft (17 l/h) umspült, der sie die Einatemungsluft entnahmen und die Ausatemungsluft beimengten. Das Luftgemisch wurde einem Exhalationsmeßplatz der Firma Friesicke und Höpfner, Modell E-Lab 3133/13 in der Modifikation nach Prof. SATTLER, zugeführt. Der  $\text{CO}_2$ -Gehalt wurde durch ein Infrarotabsorptionsmeßgerät der Firma Mayhack gemessen. Zur Ermittlung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität wurde das Luftgemisch durch eine Meßküvette geleitet, der zwei Durchflußzählrohre angeschlossen waren. Über eine Differenzstufe konnte der Null-Effekt parallelgeschalteter Zählrohre substrahiert werden. Ein nachgeschaltetes Ratemeter bildete die Impulsrate der Meßimpulsfolge. Die Meßdaten wurden von einem dreikanaligen Punktdrucker übernommen. Die Registrierung erfolgte bei einem Papiervorschub von 6 cm/h und einem Ratemeterbereich von  $0-3 \times 10^4$  Zerfällen/Min. für die gesamte Skalenbreite.

Bei dieser Versuchsanordnung ergab sich die vom Versuchstier pro Zeiteinheit abgegebene Menge  $\text{CO}_2$  als Produkt aus dem  $\text{CO}_2$ -Gehalt des Luftgemisches und der Gesamtdurchflußmenge. Dieser einfache Ansatz ist darin begründet, daß die Frischluft (Einatemungsluft) nur spurenmäßig  $\text{CO}_2$ -Anteile enthält, so daß die gemessene Menge ausschließlich vom Versuchstier produziert worden sein muß.

Abbildung 2 :    Exhalationsmeßplatz E - Lab 3133/13.

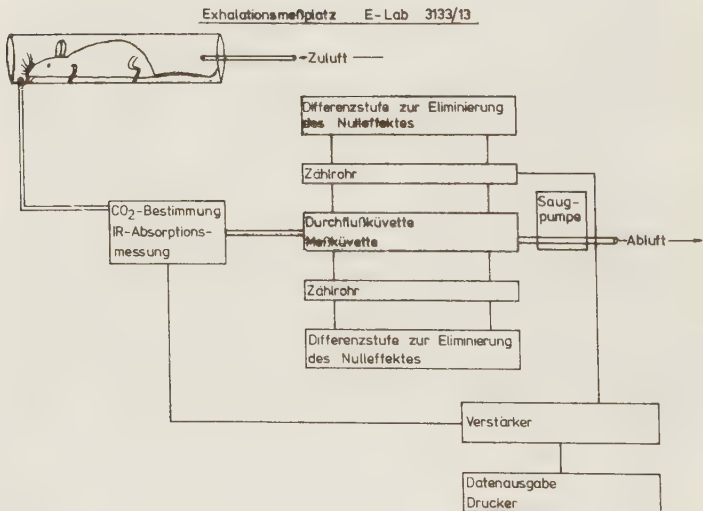
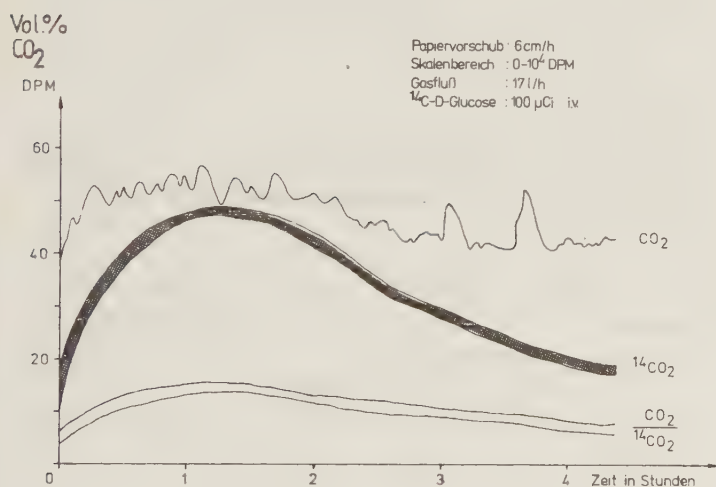


Abbildung 3 : Darstellung der Konzentrationsverläufe von  $^{14}\text{CO}_2$  und  $\text{CO}_2$  in der Expirationsluft der Ratte in Abhängigkeit von der Zeit nach i.v. Injektion von  $100 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-D-Glukose}$ .



Die  $\text{CO}_2$ -Kurve läßt erkennen, daß unmittelbar nach Versuchsbeginn ein mittleres Niveau erreicht wird, das in Abhängigkeit von gesteigerter oder verminderter körperlicher Aktivität Peaks aufweist. Der Stoffwechsel der Versuchstiere entspricht einer mittleren Umsatzrate,

d.h. die Produktion des Stoffwechselendproduktes  $\text{CO}_2$  läuft unter Normalbedingungen ab. Die Registrierung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion zeigt, daß erst einige Zeit nach Versuchsbeginn - und dann mit einem relativ steilen Anstieg - ein Konzentrationsniveau erreicht wird, das für ein bestimmtes Zeitintervall plateauartig erhalten bleibt und dann, gemessen an der Anstiegssteilheit, langsam und gleichmäßig wieder absinkt, ohne im Registrierzeitraum die Ausgangslinie zu erreichen. Der dritte Kurvenverlauf ergibt sich aus der Quotientenbildung  $^{14}\text{CO}_2 / \text{CO}_2$ . Ein zur X-Achse weitgehend paralleler Kurvenverlauf resultiert aus einem konstanten Verhältnis von  $^{14}\text{CO}_2 - \text{CO}_2$ . Hieraus darf auf einen gleichbleibenden prozentualen Anteil der  $^{14}\text{C-D}$ -Glukose an der Gesamtglukoseverbrennung geschlossen werden.

Dieser Kurvenverlauf stellt sich bei gleicher Applikationsmenge an  $^{14}\text{C-D}$ -Glukose in identischer Weise nach intravenöser Injektion und nach Sondenapplikation ein. Nach i.v. Injektion ist der Anstieg zwar steiler als nach Sondenapplikation, aber flacher als der  $\text{CO}_2$ -Kurvenverlauf.

Wenn man bedenkt, daß die applizierte  $^{14}\text{C-D}$ -Glukose zuerst in die Leber gelangt - nach i.v. Gabe schneller als nach Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt - und von dort aus als Teilmenge der insgesamt aus dem Organismus freigesetzten Glukose weiterverteilt wird, dann erklären sich diese Kurvenbilder eindeutig.

Dieses durch Serienuntersuchungen bestätigte Ergebnis erfüllte die erste Voraussetzung für eine quantitative Verteilungsmessung von  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose im Organismus. Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß während und innerhalb der Plateaubildung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation bei einem gleichbleibenden Quotienten von  $^{14}\text{CO}_2$  und  $\text{CO}_2$  ein Zeitraum gekennzeichnet ist, in dem der Anteil der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose am Verbrennungsprozeß der Gesamtglukose gleich bleibt.

Als eine weitere Voraussetzung für Vergleichsuntersuchungen war der Nachweis zu erbringen, daß innerhalb eines bestimmten Zeitraumes in gleichen Organen bei verschiedenen Versuchstieren nach gleicher Applikationsmenge die gleichen  $^{14}\text{C}$ -Anteile vorgefunden werden.

In einer Untersuchungsserie wurden Gesamtbilanzen erstellt, um darzulegen, daß mit den angewandten Nachweisverfahren die dem Versuchstier applizierte Gesamtradioaktivität wiedergefunden wurde. Wie die in Tabelle 1 aufgeführten Aktivitätsmessungen erkennen lassen, beträgt die in den einzelnen Organen, im Gesamthomogenisat des Restkörpers und in der Exhalationsluft registrierte  $^{14}\text{CO}_2$ -Menge 90 - 95% der injizierten  $100 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Aktivität.

Tabelle (1):

Wiederfindungsrate an  $^{14}\text{C}$ -D-Glucose nach i.v. Injektion von 100  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glucose; ORGANEXTRAKTE

| ORGAN                           | TIER I (GESAMTGEWICHT 405,1 g) |         |                  |                                       | WIEDERFINDUNGS-<br>RATE |
|---------------------------------|--------------------------------|---------|------------------|---------------------------------------|-------------------------|
|                                 | GEWICHT<br>(g)                 | DPM/mg  | $\mu\text{Ci/g}$ | GESAMTAKTIVITÄT<br>( $\mu\text{Ci}$ ) |                         |
| Gehirn                          | 1,8640                         | 1382,00 | 0,580            | 1,093                                 | → 99,340 %              |
| GES. TIER                       | 380,349                        | 369,0   | 0,368            | 63,795                                |                         |
| HERZ                            | 1,4057                         | 840,0   | 0,382            | 0,560                                 |                         |
| LUNGE                           | 1,388                          | 559,0   | 0,254            | 0,393                                 |                         |
| LEBER                           | 10,192                         | 1349,0  | 0,522            | 9,502                                 |                         |
| NILZ                            | 0,675                          | 1361,60 | 0,528            | 0,357                                 |                         |
| NIERE                           | 3,020                          | 695,0   | 0,280            | 0,878                                 |                         |
| GEWISCH                         |                                |         |                  | 72,095                                |                         |
| TIER II (GESAMTGEWICHT 411,1 g) |                                |         |                  |                                       |                         |
| Gehirn                          | 2,0016                         | 1657,89 | 0,754            | 1,575                                 | → 99,290 %              |
| GES. TIER                       | 387,346                        | 401,0   | 0,382            | 70,566                                |                         |
| HERZ                            | 1,532                          | 783,0   | 0,360            | 0,544                                 |                         |
| LUNGE                           | 2,779                          | 609,0   | 0,315            | 0,857                                 |                         |
| LEBER                           | 15,6491                        | 1409,0  | 0,664            | 10,276                                |                         |
| NILZ                            | 0,8657                         | 2380,0  | 1,082            | 0,911                                 |                         |
| NIERE                           | 3,1657                         | 717,900 | 0,326            | 1,025                                 |                         |
| GEWISCH                         |                                |         |                  | 13,676                                |                         |

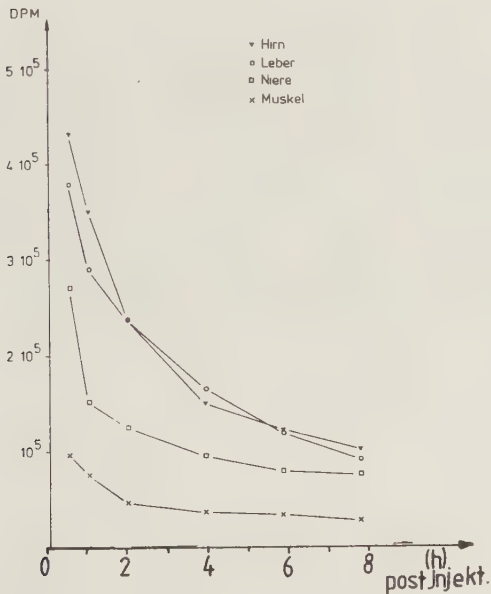
GesTier = Gesamthomogenisat des Restkörpers  
Gemisch = Exhalationsluft

Die Aufnahme einer bolusartig injizierten  $^{14}\text{C}$ -Glukosemenge in die einzelnen Organe und die Abhängigkeit des prozentualen Verteilungsmusters von der Tötungszeit nach der Applikation lassen erkennen, daß die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe bis zu 2 Stunden nach der Applikation das relativ höchste Ausmaß gegenüber anderen Organkompartimenten erreicht.

Der Abfall der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im gesamten Zeitverlauf ist in allen Organen innerhalb eines Zeitintervalles kurz nach der  $^{14}\text{C}$ -Glukoseapplikation am stärksten. In der Zeitspanne zwischen der ersten und der zweiten Stunde ist der Abfall gleichmäßig geringer. Im Hirngewebe ist der Aktivitätsverlust im weiteren Zeitverlauf deutlicher als in der Leber, der Niere und der Muskulatur.

Abbildung 4:

Absolutaktivitäten in Hirn, Leber, Niere und Muskulatur der Ratte nach i.v. Injektion von 25  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glukose. Graphische Darstellung des Zeitverlaufes.



Die in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnisse wurden aus folgender Versuchsanordnung gewonnen:

Nach intravenöser Applikation von  $25 \mu\text{Ci}/50 \mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glukose erfolgte für eine Versuchsdauer von 30 Minuten (60 Min. - 120 Min. - 240 Min. - 360 Min. - 480 Min. - und mehr als 600 Min.) die Überwachung der Stoffwechselrate im Exhalationsmeßplatz durch Registrierung der  $\text{CO}_2$ -Produktion und des  $^{14}\text{CO}_2$ -Anteiles.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere in reiner Stickstoffatmosphäre getötet und die Organe Gehirn, Leber, Niere und Muskulatur sofort entnommen und gewogen. Organproben wurden anschließend zur Bestimmung des  $^{14}\text{C}$ -Gehaltes solubilisiert. Dies geschah durch Zusatz von 3 ml Solubilizer der Firma Zinser/Frankfurt zu 200 mg Gewebe.

Bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  waren die Gewebeproben innerhalb von 24 Stunden vollkommen aufgelöst. Durch Zusatz von Wasserstoffsuperoxid (30%) wurden Farbungleichheiten der Probenabsätze über eine Oxidation der Blutfarbstoffkomponenten beseitigt. Nach Zusatz von 5 ml Szintillatorflüssigkeit der Firma Zinser/Frankfurt konnte die  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen werden.

Tabelle (21):

Absolutaktivitäten (DPM) in Hirn, Leber, Niere und Muskulatur der Ratte nach i.v. Verabreichung von  $25 \mu\text{Ci} / 50 \mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glucose - Zeitverlauf -

Applizierte Menge an  $^{14}\text{C}$ -D-Glucose (i.v.):  $25 \mu\text{Ci} / 50 \mu\text{l}$  phys. NaCl - Lösung

| ZEIT                  | TIER | DPM              |                  |                  |                 |
|-----------------------|------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
|                       |      | HIRN             | LEBER            | NIERE            | MUSKEL          |
| $\frac{1}{2}$<br>Std. | 1    | 428667           | 298695           | 287622           | 99012           |
|                       | 2    | 338649           | 433097           | 261912           | 110737          |
|                       | 3    | 483046           | 402990           | 279546           | 90957           |
|                       | 4    | 426367           | 398866           | 291954           | 96225           |
|                       | 5    | 497023           | 363640           | 289569           | 83650           |
|                       |      | $\bar{x}=432785$ | $\bar{x}=379657$ | $\bar{x}=271541$ | $\bar{x}=96114$ |
| 1<br>Std.             | 6    | 370509           | 356884           | 117220           | 59511           |
|                       | 7    | 279378           | 231113           | 136220           | 99075           |
|                       | 8    | 366148           | 297057           | 152557           | 83664           |
|                       | 9    | 382901           | 276347           | 161882           | 52153           |
|                       |      | $\bar{x}=351584$ | $\bar{x}=290850$ | $\bar{x}=151854$ | $\bar{x}=72600$ |
| 2<br>Std.             | 10   | 257929           | 310512           | 138297           | 41133           |
|                       | 11   | 298629           | 236079           | 145218           | 64793           |
|                       | 12   | 228602           | 132919           | 102966           | 40443           |
|                       | 13   | 254239           | 333751           | 159662           | 64925           |
|                       | 14   | 172085           | 164069           | 84774            | 35049           |
|                       |      | $\bar{x}=238802$ | $\bar{x}=256087$ | $\bar{x}=136119$ | $\bar{x}=55665$ |
| 4<br>Std.             | 16   | 167236           | 117386           | 87794            | 48809           |
|                       | 17   | 98070            | 188401           | 84430            | 25475           |
|                       | 18   | 149468           | 177227           | 101415           | 34447           |
|                       | 19   | 150177           | 147801           | 88094            | 25587           |
|                       | 20   | 189005           | 189675           | 110097           | 44064           |
|                       |      | $\bar{x}=149351$ | $\bar{x}=164114$ | $\bar{x}=94360$  | $\bar{x}=35416$ |
| 6<br>Std.             | 21   | 132871           | 137752           | 79159            | 36073           |
|                       | 22   | 114770           | 104035           | 74052            | 38232           |
|                       | 23   | 135241           | 125288           | 76423            | 27101           |
|                       | 24   | 99070            | 106063           | 72383            | 35481           |
|                       |      | $\bar{x}=120298$ | $\bar{x}=118359$ | $\bar{x}=78104$  | $\bar{x}=33036$ |
| 8<br>Std.             | 25   | 108750           | 92853            | 75658            | 28644           |
| 11<br>Std.            | 26   | 93309            | 102622           | 63464            | 17516           |
|                       | 27   | 143647           | 126571           | 92319            | 58132           |
|                       | 28   | 42958            | 51079            | 48264            | 31739           |
|                       |      | $\bar{x}=109971$ | $\bar{x}=85424$  | $\bar{x}=67659$  | $\bar{x}=35795$ |

#### II.4) Grundlagen der Autoradiographie.

Prinzip der Autoradiographie von Geweben und Zellen ist die "Belichtung" photosensibler Emulsionen durch direkt ionisierende Strahlung von Radionukliden, die von Gewebe oder Einzelzellen inkorporiert wurden.

Radionuklide mit direkt ionisierender Strahlung (Korpuskularstrahlung) vom Typ der Alpha-, Beta- und Gamma-Strahlung können über die Wechselwirkung ihrer emittierten Korpuskeln mit den Absorberatomen der Photoemulsion (AgBr) genügend Energien freisetzen, so daß die notwendigen Reaktionen ablaufen, die letztlich als Schwärzung im entwickelten und fixierten Autoradiogramm sichtbar werden. Entsprechend der unterschiedlichen physikalischen Parameter der verschiedenen in der Autoradiographie verwendeten Strahler (Reichweite, Ausbreitungsmodus und Ionisationsdichte) kommt es zu unterschiedlichen Effekten in der photographischen Schicht. In jedem Fall ist ein mehr oder weniger konturiertes Latenzbild (Negativbild) der Gewebs- und Zellinkorporationen das Ergebnis, das durch die anschließende Entwicklung und Fixierung der Emulsion stabilisiert wird (Positivbild). Die Photoemulsionen bestehen aus einer Gelatineschicht, die Silberbromidkristalle (AgBr) in verschiedener Größe und unterschiedlicher Dicke enthalten. Grobkörnigkeit und quantitativ hoher Anteil an Silberbromidkristallen sowie eine große Schichtdicke der Photoemulsion führen zu einer Steigerung der Empfindlichkeit, während kleine Kristalle bei kleiner Schichtdicke ein besseres Auflösungsvermögen bewirken.

Beim Durchtritt der Korpuskularstrahlung durch die Photoemulsion kommt es zu Kollisionen zwischen den Teilchen und den Absorberatomen (Atome im Kristallgitter des Silberbromids). Hüllenelektronen werden aus dem Verband der Atome des Silberbromids herausgeschlagen, so daß Ionen entstehen. An bestimmten Stellen in den Kristallgittern sammeln sich die aus ihrem Verband herausgelösten Elektronen und bilden negativ geladene Pole, die wiederum durch positiv geladene Silberionen aus dem Kristallzwischengitter neutralisiert werden. Auf diese Weise entsteht photolytisches Silber als metallisches Silber und bildet in der Photoemulsion ein sogenanntes Latenzbild. Durch die Entwicklerlösung und das Fixiersalz - d.h. durch langsame Reduktion derjenigen Silberbromidkristalle, die nicht in Form eines "latenten Bildes" vorliegen - und durch Herauslösung des nicht reduzierten Silberbromids entsteht ein reales Bild auf der nunmehr durchsichtig gewordenen Photoemulsion. Das zu Fadennäueln zusammengelagerte metallische Silber läßt sich je nach Betrachtungsweise und Vergrößerungsmaßstab entweder als Schwärzung der photographischen Schicht oder als Silberkörnchen ausmachen.

Man unterscheidet Makro- und Mikroautoradiographie bzw. Ultramikroautoradiographie und bezieht sich dabei auf den Vergrößerungsmaßstab, mit dem die belichtete, entwickelte und fixierte Photoemulsion betrachtet und ausgewertet wird.

Unter der quantitativen Auswertung von Autoradiogrammen versteht man im allgemeinen die Bestimmung der Konzentrationen einer radioaktiv markierten Substanz in Abhängigkeit von den jeweiligen Ortskoordinaten, d.h. die Bestimmung der im interessierenden Bereich integral enthaltenen Substanzmenge. Zwischen der Schwärzung und dem Produkt aus Flächenaktivität und Expositionszeit (Fluenz) (42) besteht für Kernstrahlung eine Proportionalität, so daß eine quantitative Auswertung über die Messung der Schwärzungsintensität des Autoradiogrammes möglich ist. Verfahrenstechnisch werden in der Literatur für die quantitative Auswertung von Autoradiogrammen verschiedene nicht automatische und automatische Methoden angegeben. Die aufwendigste, aber auch die genaueste Methode zur quantitativen Auswertung von Autoradiographien besteht in der Bestimmung der Silberkorn-dichte mit bloßem Auge über das Lichtmikroskop (19;131; 170;171;183).

Bei dieser für die Mikroautoradiographie auf zellulärer Ebene entwickelten Meßmethode können 150 Silberkörner je Zelle oder interessierende Struktur erfaßt werden, wobei methodische Ungenauigkeiten ab 25 - 30 Silberkörnern/Zelle auftreten. Für die Auswertung von Makroautoradiogrammen ist die Methode ungeeignet. Unter der Voraussetzung, daß die Silberkörner in der entwickelten Photoemulsion gute Trennungen aufweisen - d.h. nur bei kurzer Expositionszeit der gewebsinkorporierten Radionuklide gegenüber der Photoemulsion - , haben sich komplizierte halbautomatische TV-Zählsysteme bewährt (31; 42;74;120;136;172).

Für die Auswertung von Mikroautoradiogrammen hat sich ferner ein von DÖRMER inauguriertes und von anderen Autoren variiertes Verfahren (26;27;28;29;30;57;58;149;150) empfohlen, bei dem als Maß für die Silberkorndichte das von den einzelnen Silberbromidkristallen reflektierte Licht integral gemessen wird. Die Methode stellt ein Auflichtreflexionsverfahren dar, bei dem während des Auswertvorganges Präparat und auszuwertende Emulsion in Kontakt bleiben. Diesen Umstand bezeichnet DÖRMER selbst als methodischen Unsicherheitsfaktor und gibt als Grenze der Proportionalität zwischen Silberkornzahl und reflektiertem Licht eine Zahl von 70 Silberkörnern pro  $\mu\text{m}^2$  ( $70 \text{ SK}/\mu\text{m}^2$ ) an (29).

Ein weiteres Verfahren der quantitativen Auswertung von Mikroautoradiogrammen ist die Messung der Abschwächung von durchfallendem Licht (Durchlichtphotometrie, Transmissionsmessung) (22). Die Transmission (T) ist hierbei über den Quotienten  $J_0/J_t$  definiert ( $J_0$  = Intensität des einfallenden Lichtes,  $J_t$  = Intensität des Lichtes nach Passage durch das Präparat).

Die Umformung der physikalischen Zusammenhänge bei der Transmissionsmessung (Durchlichtphotometrie) führt zur weiteren Anwendung des Prinzips in Form der Absorptionsmessung (Absorptionsphotometrie) (39;128). Die Absorption ist definiert als der Kehrwert der Transmission.

$$\left( \text{Absorption} = \frac{1}{\text{Transmission}} \right)$$

Die Messung der Absorbance ist die letzte Spielart des oben genannten Prinzips zur quantitativen Auswertung von Autoradiogrammen im Durchlicht.

Folgende Größen werden hierbei synonym gebraucht:

$$\begin{aligned} \text{Absorbance} &= \text{Optical Density} = \text{O.D.} = \text{Extinktion} = E \\ &= -\log T = \log \frac{1}{T} = \log \frac{J_0}{J_t}, \text{ wobei } J_0 \text{ wiederum die} \end{aligned}$$

Intensität des einfallenden Lichtes bezeichnet und  $J_t$  die Intensität des Lichtes nach Passage durch das Präparat. Die mittlere Extinktion  $\bar{E} = -\log \bar{T}$  bezieht sich auf heterogene Präparate, wobei  $\bar{T}$  die mittlere Transmission eines solchen Präparates bezeichnet. Die integrierte Extinktion  $\dot{A}\bar{E}$  bezieht sich auf ein bestimmtes heterogenes Präparat (wie bei der Scanning-Mikrodensitometrie verwandt), wobei  $\dot{A}$  der ins Objektfeld des Instrumentes projizierte Ausschnitt des Präparates ist, und  $\bar{E}$  dessen mittlere Extinktion bezeichnet.

Wie später noch zu erläutern sein wird, bietet das Verfahren der Scanning-Mikrodensitometrie (Mikro-Absorptionsphotometrie im Durchlicht) den unbestreitbaren Vorteil, daß Präparat und photoempfindliche Schicht während der Auswertung voneinander getrennt werden können. Aus diesem Grunde kommt in der vorliegenden Arbeit ausschließlich dieses Verfahren zur Anwendung. In Anlehnung an die Fragestellung muß nicht nur das Radionuklid adaptiert werden, sondern auch die Technik der Autoradiographieherstellung, d.h. in besonderer Weise die Verwendung des Filmmaterials. Die Mehrzahl der besprochenen Meßverfahren ist für die Aus-

wertung von Autoradiogrammen ausgelegt, die mit der Stripping-Technik nach PELC (131) unter Verwendung von Kodak AR - 10 Stripping Emulsion oder nach der Dipping-Technik nach ROGERS (149) mit Ilford G 5 NuclearemulSION angefertigt worden sind. In beiden Verfahren wird das zu exponierende Gewebe in Kontakt mit wäßrigen Lösungen gebracht. Während der Strippingfilm im Wasserbad auf das auf einem Objektträger fixierte Gewebsstück aufgezogen wird, ist bei der Dippingfilmtechnik die Photoemulsion selbst in Gel-form vorhanden und enthält damit einen sehr hohen Wasseranteil. Werden für die Fixation des zu autoradiographierenden Gewebes keine speziell dehydrierenden Maßnahmen verwandt, so kommt es zu Verschiebungen der Wasseranteile zwischen Film und Gewebe, so daß im fertigen Autoradiogramm die Ausgangsverhältnisse der Tracerlokalisation nicht mehr gewahrt sind (148;169;180;181).

Paraffingebundene Fixierungsmethoden für die Lichtmikroskopie oder auf Osmiumtetroxid basierende für die Elektronenmikroskopie beinhalten die Dehydrierung des Gewebes in alkoholischen Reihen und sind damit für Autoradiographien wasserlöslicher Nuklide nicht zu verwenden. Die Autoradiographie wasserlöslicher Substanzen hat sich aus diesem Grunde zunehmend auf die Gefrierschnitt-Technik konzentriert, wobei Probleme mit Tau- und Gefriervorgängen bzw. Kristallbildung im Gewebe während des Schneidevorganges und der Exposition Schwierigkeiten bereiten (169;180;181). Die

Freeze-Fracture-Methode von RIX (148) stellt ein Verfahren zur Autoradiographie wasserlöslicher Substanzen dar, das mit hohem Aufwand Artefakte durch Kristallisationsvorgänge im Gewebe und Wasserverschiebungen durch Tauvorgänge zu umgehen versucht. Ähnlich dem Verfahren von HOROWITZ (77) bedient sie sich Temperaturbereichen von  $-196^{\circ}\text{C}$  bis  $-85^{\circ}\text{C}$ , die während der gesamten Prozedur eingehalten werden müssen. Eine artefaktfreie Zuordnung von Silberkorndichten zur inkorporierten Aktivität auf der Ebene des Auflösungsvermögens von Elektronenmikroskopen macht diesen Aufwand notwendig. Im Gegensatz zu den diversen und explizit beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Silberkorndichten im Bereich von 5 - 150 Silberkörnern auf zellulärer Ebene in der hochauflösenden Autoradiographie sind quantitative Verfahren, die über den Bereich der visuell oder automatisiert auszählbaren Silberkorndichten hinausgehen und zudem Flächenvergleiche zulassen, nur mangelhaft beschrieben. Die Schwärzungsintensität der Autoradiogramme weist einen hohen Informationsgehalt auf ( $10^5 - 10^7 \text{ bit/cm}^2$ ) (42), der sich über Absorptionsmessungen in eine meßbare Größe übertragen läßt. Eine lineare Korrelation von Silberkornzahl und Absorption wurde für nicht zu hohe Silberkorndichten (O.D. von 0.1 - 0.8) von FISCHER und WERNER (39) und von GOLDSTEIN und WILLIAMS (54;55) an Eichpräparaten für den Mikrobereich gezeigt und ist für Filmschichten seit langem bekannt.

Aus der Problemstellung ergibt sich die Frage, ob gleichgeartete Korrelationen wie für den Mikrobereich auch für den Makrobereich gefunden werden können (z.B. Optical Density zu Schwärzung).

Aus diesem Grunde wurde die relative Silberkorndichte pro Flächenabschnitt im Autoradiogramm bestimmt. Dazu wird im Durchlicht die Extinktion gemessen, und die Einzelwerte werden im Computer gespeichert. Die Anwendung eines Scanning-Mikroskop-Photometers erlaubt die Analyse inhomogen markierter Schnitte, wobei den jeweils differierenden Schwärzungsintensitäten auch entsprechend unterschiedliche Extinktionen zugeordnet werden.

#### 11.5) Methodik der Autoradiogramm-Herstellung.

Für die in der vorliegenden Arbeit angestrebte Autoradiographie zum Vergleich lokaler und flächiger Verteilungsmuster der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose im Hirngewebe ergab sich als zweckmäßigste Aufbereitungsform des Hirngewebes die Gefrierschnitt-Technik, damit die Verteilung des wasserlöslichen Tracers  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose keine Alteration erfährt.

Sämtliche Gefrierschnitte wurden mit einem PMV-Cryo-Mikrotom angefertigt. Typ-Bezeichnung: LKB 2258 PMV Modell 160 MP der Firma LKB/Stockholm.

Das Cryo-Mikrotom ist darauf ausgelegt, alle physiologischerweise auftretenden Gewebearten bis hin zu einer Objektgröße von 14 x 16 cm zu schneiden.

Die gewünschte Schnittlänge kann durch verschiebbare Grenzscharter am Schaltpult in einem Bereich von 40 mm bis hin zu 160 mm variabel eingestellt werden. Die Schnittstärke läßt sich in einem Bereich von 1 - 990 µm beliebig wählen.

In dieser Arbeit kommen Hirnschnitte ausschließlich in vier verschiedenen Schnittstärken vor: 25 µm, 50 µm, 75 µm und 100 µm. Dabei wird so vorgegangen, daß das basal auf den Objektisch aufgefrorene und in Methylzellulose eingebettete Hirn von der Hemisphärenkonvexität in Richtung auf die basalen Strukturen in sagittaler Richtung angeschnitten wird. Per definitionem wird als Schnitt Nummer 1 derjenige bezeichnet, der gerade eben die Eröffnung des Seitenventrikels markiert. Von diesem Punkt an wird jeder weitere Schnitt in Serie verwandt, wobei die ersten 5 Schnitte 25 µm, die nächsten fünf 50 µm, die darauffolgenden 5 Schnitte 75 µm und die letzten 5 Schnitte 100 µm dick sind. Dieses Vorgehen garantiert von Hirn zu Hirn kompatible und vergleichbare Schnittebenen.

In jedem Hirn wird demnach ein Bereich von 1250 µm - unterteilt in Schnitte verschiedener Stärke - untersucht. Die genaue Festlegung der Höhe, ab der die folgenden Schnitte in Serie verwendet werden, gewährleistet einen für jedes Hirn weitgehend identischen, analysierten Bereich. Die Schnitte werden in einem temperierten Arbeitsraum des Cryostaten bei -25°C angefertigt, auf eine PVC-Folie aufgezogen und 24 Stunden gefriergetrocknet.

Spezifikation der Hirnschnitte

Ausgangspunkt • Ausgangsschnitebene = Eröffnung der Seitenventrikel

| lfd. Nummer der Schnitte | Schnittdicke (Mikrometer) |                |
|--------------------------|---------------------------|----------------|
| 1 - 5                    | 25                        | } 1250 $\mu$ m |
| 6 - 10                   | 50                        |                |
| 11 - 15                  | 75                        |                |
| 16 - 20                  | 100                       |                |

Sämtliche Autoradiographien wurden auf handelsüblichem Röntgenfilm angefertigt.

Bezeichnung: Kodak-X-Omat-S Blattfilm.

Format: 24 x 30 cm.

Die gefriergetrockneten und auf Plastikfilm aufgezogenen Hirnschnitte werden in der Dunkelkammer auf den Röntgenblattfilm aufgeklebt. Dieser Vorgang wird wesentlich durch den Umstand erleichtert, daß der Plastikfilm, auf den der Hirnschnitt aufgezogen ist, einseitig klebend beschichtet ist.

Die Exposition der gefriergetrockneten Gewebeschnitte gegenüber der Photoemulsion eines Röntgenfilms erfolgte mit Hilfe handelsüblicher Aluminiumröntgenfilmkassetten in der modifizierten Sandwichtechnik in Anlehnung an die Methoden von HOROWITZ (75;76;77).

Die Entwicklung der exponierten Röntgenfilme erfolgte maschinell im Kodak Rp X-Omat Processor (Rapid Processing).

Entwickler: Kodak Rp X-Omat MX-810.

Es wurden ausschließlich die von Kodak für diesen Filmtyp empfohlenen Mischungsverhältnisse für den Entwickleransatz angewendet.

Die Entwicklung und Fixierung der Filme erfolgte automatisch durch den programmierten Rp X-Omat Processor in 90 Sekunden.

## II.6) Grundlagen der Densitometrie.

Quantitative autoradiographische Verfahren zur Auswertung auf zellulärer bzw. licht- und elektronenmikroskopischer Ebene bedienen sich optischer Systeme, die das von den einzelnen im Autoradiogramm enthaltenen Silberkörnern reflektierte Licht aufnehmen und messen (Auflicht-Reflexionsphotometrie), bzw. basieren auf einer direkten Auszählung der Silberkornverteilung. Es bleibt zu bemerken, daß hierbei während des Auswert- und Meßvorganges das histologische Präparat und die photoempfindliche Emulsion in engem Kontakt bleiben.

Diese Verfahren eignen sich entweder aufgrund der notwendigen histologischen Aufbereitung des Gewebes (EM-Mikroskopie, Dehydrierung) oder wegen der spezifischen Eigenarten der zur Anwendung gebrachten Filmemulsionen (hoher Wassergehalt des Dipping-Filmes; Wasserbad beim Aufziehen des Stripping-Filmes) nur mit erheblichen Einschränkungen zum quantitativen autoradiographischen Nachweis gewebssinkorporierter wasserlöslicher Nuklide. Will man den extrem hohen technischen Aufwand der quantitativen Autoradiographie wasserlöslicher Radionuklide unter den Bedingungen von Ultra-Tieftemperaturen (Ultra-low temperature autoradiography, Freeze-Fracture-Method) umgehen, so ist es notwendig, nach stattgehabter Exposition das radionuklidtragende histologische Präparat von der Photoemulsion zu trennen.

Das hiernach entwickelte und fixierte Autoradiogramm ist nunmehr frei von stark absorbierendem Material, wie es ein histologisches Präparat darstellt, und kann quantitativ im Durchschnitt ausgewertet werden (Durchlicht-Absorptionsphotometrie).

Dazu benutzt man die gleichen Voraussetzungen wie in der "Makro"-Photometrie mit Küvetten. Man mißt die Lichtabsorption eines Objektes ( $J$ ) im Vergleich zu einem Leerwert ( $J_0$ ) außerhalb des Objektes.

Für den Zusammenhang dieser Größen mit den physikalischen Eigenschaften des absorbierenden Mediums gilt das Gesetz von LAMBERT und BEER, wobei homogene "Substanzverteilung" des Absorbers vorausgesetzt wird.

Gesetz von LAMBERT, BEER und BOUGUER:

$$J = J_0 \cdot e^{-\mathcal{E} \cdot c \cdot d}$$

Die Umformung unter Verwendung des dekadischen Logarithmus ergibt:

$$\log \frac{J}{J_0} = -\mathcal{E} \cdot c \cdot d = -E \quad \text{bzw.} \quad E = -\log \frac{J_0}{J} = \mathcal{E} \cdot c \cdot d$$

Es bedeuten:

E = Extinktion = Optische Dichte = Optical Density (O.D.)

$J_0$  = Intensität des einfallenden Lichtes

J = Intensität des durchgelassenen Lichtes

$\mathcal{E}$  = Spezifischer molarer Extinktionskoeffizient ( $\frac{\text{cm}^2}{\text{mol}}$ )

c = Konzentration (Dichte) der absorbierenden Verbindung ( $\frac{\text{mol}}{\text{cm}^3}$ )

d = Dichte der vom Licht durchsetzten Schicht der Silberbromidkristalle in der entwickelten Photoemulsion  
(für Filmmaterial konstant).

Die Extinktion (O.D.) ist mithin ein Maß für die "Schwärzung", d.h. die Silberkorndichte/Flächeneinheit des Filmmaterials.

E = EXTINKTION = (O.D.) = Integrale Silberkorndichte in der entwickelten Photoemulsion = Schwärzung.

Die ABSORPTION des einfallenden Lichtes beim Durchgang durch ein absorbierendes Medium A ergibt sich zu:

$$A = \frac{J_0 - J}{J_0}$$

Der TRANSMISSIONSGRAD  $\delta$  ist mit  $\delta = \frac{J}{J_0}$  definiert.

Die Auswertung der entwickelten und fixierten Autoradiogramme erfolgt mit einem Scanning-Mikroskop-Photometer der Firma Zeiss, Oberkochen (SPM - 05), an das ein Laborcomputer angeschlossen ist (PDP - 12).

Prinzip des Verfahrens ist die Messung des Transmissionsgrades monochromatischen Lichtes.

Objektiv: NEOFLUAR 6,3 / 0,20

Kondensor: NEOFLUAR 6,3 / 0,20.

Als Meßblende wird eine variabel einstellbare Rechteckblende gewählt, deren Seitenlänge den räumlichen Erfordernissen der auszumessenden Autoradiogramme entsprechend auf 100, 200 oder 400 Mikrometer eingestellt wird.

Die Leuchtfeldblende wird um den Faktor 1.2 größer als die Meßblende gewählt, um den Streulichtanteil klein zu halten.

Die Absorptionsmessungen werden bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 460 \text{ nm}$  vorgenommen.

Die auszuwertende Autoradiographie wird zwischen zwei entspiegelten Objektträgern so befestigt, daß über die

ganze Fläche des Autoradiogrammes gleiche Tiefenschärfe erreicht wird, und ein Nachfokussieren sich erübrigt.

Die Schrittlänge des automatischen Scanningtisches in x- und y-Richtung wird so gewählt, daß ein lückenloses Vermessen des Autoradiogrammes erreicht wird. Die Steuerung des Scanningtisches und auch die Datenübernahme und -auswertung erfolgen mit dem zentralen Steuerungsprogramm APAMOS (Firma C. Zeiss, Oberkochen), wobei über verschiedene Unterprogramme Einzelheiten im Meßvorgang herausgegriffen und näher analysiert werden können. (APAMOS: Automatische Photometrische Analyse Mikroskopischer Objekte durch Scanning)

Alle Meßdaten werden zunächst auf Magnetbänder (MAG-TAPES) gespeichert und anschließend über den Rechner im OFF-LINE-Betrieb ausgewertet.

Die in der Meßanordnung verwendeten Vergrößerungen erlauben keine Auflösung der einzelnen Silberkörner; vielmehr wird ein integraler Transmissionsverlust gemessen, der die Summe aller Absorptionsquerschnitte der im Meßfeld liegenden Silberkörner repräsentiert.

Die Meßanordnung erfaßt alle Transmissionswerte zwischen 100% und 5%. Für die Auswertung werden alle Werte zwischen 95% und 5% herangezogen.

Eine Untergrundelimination wird über die Messung des integralen Transmissionsverlustes in dem Bereich des Röntgenfilmes erreicht, der nicht dem Präparat gegenüber exponiert gewesen ist. Alle in dieser Region anfallenden Meßwerte werden gemittelt und anschließend

auf 100% Transmission normiert. Damit ist dem optischen System für jedes zu messende Autoradiogramm ein individueller Bezugswert gegeben, der als Äquivalent für den Untergrund des Autoradiogrammes automatisch in die Messungen eingeht.

## II.7) Versuchsanordnung und -durchführung

Aufgrund umfangreicher Voruntersuchungen wurde zur Beantwortung der Fragestellung im Rahmen der Untersuchungen zur quantitativen Autoradiographie des  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose-Stoffwechsels von normalen und traumatisierten Rattenhirnen mit Hilfe der Mikro-Absorptionsphotometrie die folgende Versuchsanordnung aufgebaut.

### II.7.1) Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague Dawley-Ratten SBF verwendet. Das Gewicht der 8 - 10 Wochen alten Tiere betrug 200 - 250 g. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere in Gemeinschaftskäfigen gehalten und mit einem Fertigfutter und Wasser ad libidum versorgt.

## II.7.2) Versuchsanordnung

In Thalamonal<sup>R</sup>-Narkose (intramuskuläre Injektion von 0,2 - 0,3 ml Thalamonal<sup>R</sup> / 200 - 250 g Körpergewicht der Ratte) wird durch Spaltung der Kopfhaut der Schädelsknochen im frontoparietalen Bereich dargestellt. Im Winkel zwischen der Sutura coronaria und der Crista temporalis wird eine Nadelelektrode (Ø 2 mm, Länge 6 mm) senkrecht zur Knochenoberfläche durch die Kalotte in das Hirngewebe eingebracht und mit dem elektrischen Stromgeber verbunden. Die Elektrode wird mit einem Teflonscheibchen gegen die Kalotte isoliert. Das Versuchstier wird in eine flache Wanne gesetzt, die eine mit physiologischer Kochsalzlösung bedeckte Plattenelektrode enthält. Zur Erzeugung einer Koagulationsnekrose des Hirngewebes wird dem Versuchstier ein Stromstoß von 40 mA und 70 mV für die Dauer von 20 Sekunden verabreicht.

Anschließend wird die Nadelelektrode entfernt und die Wunde durch Hautnaht versorgt. Etwa 20 Minuten nach Versuchsbeginn reagieren die Tiere spontan schläfrig. Aus der Narkose erwacht, zeigen sie keinerlei neurologische Auffälligkeiten.

Nach der Traumatisierung werden die Versuchstiere 24 Stunden bei Wasser und Fertignahrung ad libidum in einem Käfig gehalten. Zur Applikation einer definierten Menge an <sup>14</sup>C-D-Glukose per Magensonde oder per i.v. Injektion werden die Versuchstiere in eine Ätherkurznarkose versetzt. Die Gesamtmenge an zugeführter Radioaktivität pro Tier in der Volumeneinheit

wird in einer Verdünnungsreihe unterschiedlich bemessen und beträgt 25, 50, 75 und 100  $\mu\text{Ci/ml}$ .

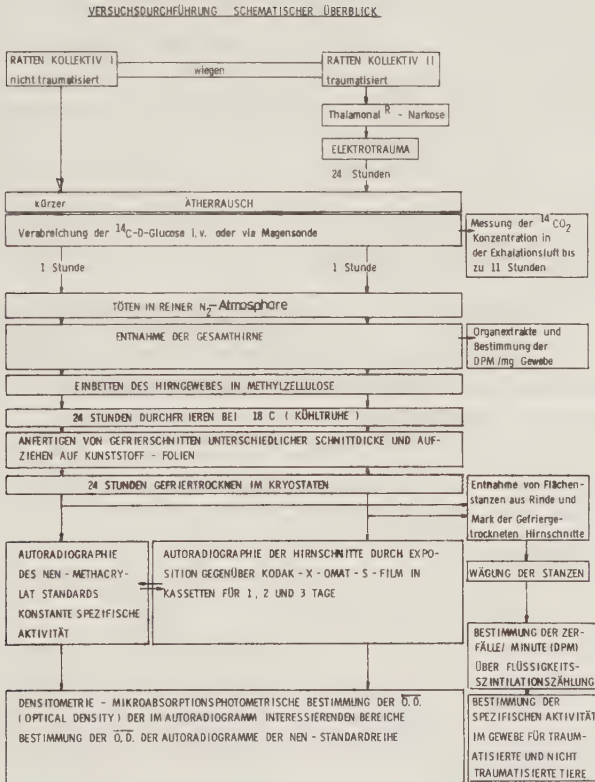
Verdünnungsreihe

| Gesamtaktivität an $^{14}\text{C-D-Glucose}$<br>in einer Probe<br>( $\mu\text{Ci } ^{14}\text{C-D-Glucose}$ ) | Volumen einer Probe<br>(o. 9%ige NaCl - Lösung)<br>bei Applikation über<br>Magensonde ( ml ) | Volumen bei Applikation<br>i. v. ( ml ) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 25                                                                                                            | 1,0                                                                                          | 0,5                                     |
| 50                                                                                                            | 1,0                                                                                          | 0,5                                     |
| 75                                                                                                            | 1,0                                                                                          | 0,5                                     |
| 100                                                                                                           | 1,0                                                                                          | 0,5                                     |

Im Anschluß an eine kontinuierliche Messung der Exhalation der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion der Ratte am Exhalationsmeßplatz erfolgt die Tötung der Tiere in 100% Stickstoffatmosphäre. Die Entnahme des Gehirnes in toto erfolgt nach Aufklappen der Kalotte durch Scherenschlag entlang der Sutura sagittalis und der Sutura squamosa. Die basalen Hirnnerven und die Medulla oblongata werden stumpf getrennt. Das Gehirn wird in einen frisch zubereiteten Methylzellulosebrei eingebettet und so 24 Stunden bei  $-22^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Die Herstellung von mikroskopischen Schnitten erfolgt in dem halbautomatischen PMV-Cryomikrotom der Firma LKB Stockholm in gewünschter Schnittdicke durch Aufziehen einer Klebefolie auf die frische Schnittfläche und Unterschneiden der Folie in vorprogrammiertem Abstand. Das auf Klebefolie haftende histologische Präparat wird für weitere 24 Stunden in der Kühltruhe zur Gefriertrocknung belassen und anschließend zur Autoradiographie für einen definierten Zeitraum 24, 48 und 72 Stunden gegen Röntgenfilm (Kodak X-Omat-S Blattfilm, Format 24 x 30 cm) exponiert. Nach der Entwicklung des Autoradiogrammes erfolgt die densitometrische Ausmessung.

Abbildung 5:



## II.8) Statistik

Folgende statistische Methoden wurden zur Prüfung der Signifikanz der Aussagen und der Berechnung der Streubreiten benutzt:

1. Die Mittelwerte und die Standardabweichung (S.D.) werden nach Gleichung a) und b) berechnet:

$$\begin{aligned} \text{a)} \quad \bar{x} &= \frac{\sum x_i}{n} \\ \text{b)} \quad \text{S.D.} &= \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n\bar{x}^2}{(n-1)}} \end{aligned}$$

2. Korrelationskoeffizient

Durch den Korrelationskoeffizienten wird die Abhängigkeit zwischen zwei Merkmalen sichergestellt. Er beträgt bei fehlender Beziehung 0 und bei streng linearer Abhängigkeit 1 (-1).

$$r = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

3. Die Regressionsgrade

Die Art der Abhängigkeit (es werden nur lineare Regressionen geprüft) und die bestmögliche Gerade ( $y = ax + b$ ) lassen sich über die Berechnung der Regressionsgrade und der Regressionskoeffizienten angeben.

$$\text{Regressionskoeffizient } b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Daraus läßt sich nach  $a = \bar{y} \cdot b\bar{x}$   $a$  berechnen und die Gerade  $\bar{y} = a + bx$  darstellen.

### III. ERGEBNISSE.

#### III.1) Darstellung der meßtechnischen Grenzbereiche der Mikro-Absorptionsphotometrie.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist der Nachweis, daß die mikro-absorptionsphotometrische Auswertung von Autoradiogrammen inhomogen mit  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose markierter Hirngewebschnitte quantitative Rückschlüsse auf die Glukose-Metabolisierung der interessierenden Gewebestrukturen erlaubt.

Dabei ist es von vorrangigem Interesse, zunächst den Meßbereich des optischen Systems abzugrenzen.

Daten- und Informationsträger der auszumessenden Autoradiogramme ist die photoempfindliche Emulsion. Eine Reihe von physikalischen und chemischen Prozessen während der Expositionszeit (Höhenstrahlung, Streustrahlung, positive und negative Chemographie) und des Entwicklungs- und Fixiervorganges bewirken eine Ausfällung von Silberbromidkristallen und damit eine Schwärzung, deren Ursache nicht direkt kausal in einer Einwirkung des aktivitätstragenden histologischen Präparates zu suchen ist. Zusammen mit dem Emulsionsträger des Röntgenfilmes - einer PVC-Folie - führt diese Schwärzung zu einer von Autoradiogramm zu Autoradiogramm in geringen Grenzen schwankenden Absorption des durchfallenden Lichtes. Dieser Effekt muß als methodenbedingt angenommen werden und wird auch als Bildrauschen oder Untergrundeffekt bezeichnet.

Des weiteren kann das Signal selbst - gemeint ist die durch direkte Einwirkung der gewebsinkorporierten radioaktiven Korpuskularstrahlung auf die Photoemulsion hervorgerufene Schwärzung - aufgrund kurzer Expositionszeiten oder geringer Radioaktivität des zu autoradiographierenden Präparates oder beidem nur schwach ausgeprägt sein.

Autoradiogramme von Hirnschnitten unterschiedlicher Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose und unterschiedlicher Schnittdicke wie Expositionszeiten sollen nach durchlichtdensitometrischer Analyse abklären, wo die untere Nachweisempfindlichkeitsschwelle des optischen Systems liegt - d.h. wann das Signal sicher vom Untergrund getrennt werden kann und wann nicht.

Abbildung 6 : Autoradiogramme - Darstellung der  
Untergrunddiskriminierung.

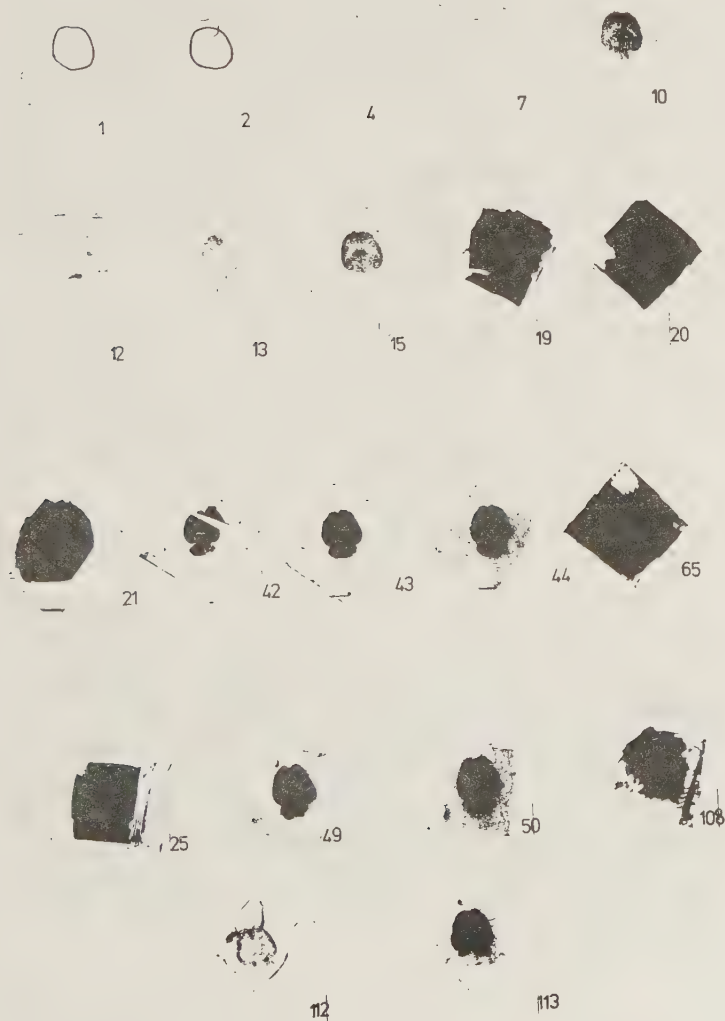


Tabelle (3):

Zusammenstellung von Autoradiogrammen von Hirnschnitten unterschiedlicher Gesamtktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glucose, Schnittdicke und Expositionszeit - Untergrunddiskriminierung

| Tier - Nummer | Arg - Nummer | Mess - Nummer | Gesamtktivität<br>( $\mu\text{Ci } ^{14}\text{C-D-Gl}$ ) | Schnittdicke<br>( $\mu\text{m}$ ) | Expositionszeit<br>(Tage) | Untergrund-<br>diskriminierung |
|---------------|--------------|---------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 11            | 1            | STA-1 / 88    | 25                                                       | 25                                | 1                         | NEIN                           |
| 11            | 2            | STA-1 / 89    | 25                                                       | 50                                | 1                         | NEIN                           |
| 11            | 4            | STA-1 / 91    | 25                                                       | 100                               | 1                         | NEIN                           |
| 11            | 7            | STA-1 / 92    | 25                                                       | 25                                | 2                         | NEIN                           |
| 11            | 10           | STA-1 / 95    | 25                                                       | 100                               | 2                         | NEIN                           |
| 11            | 12           | STA-1 / 96    | 25                                                       | 25                                | 3                         | NEIN                           |
| 11            | 13           | STA-1 / 97    | 25                                                       | 50                                | 3                         | JA                             |
| 11            | 15           | STA-1 / 99    | 25                                                       | 100                               | 3                         | JA                             |
| 1             | 19           | STA-1 / 39    | 50                                                       | 50                                | 1                         | JA                             |
| 1             | 20           | STA-1 / 41    | 50                                                       | 75                                | 1                         | JA                             |
| 1             | 21           | STA-1 / 44    | 50                                                       | 100                               | 1                         | JA                             |
| 1             | 42           | STA-1 / 63    | 50                                                       | 25                                | 2                         | NEIN                           |
| 1             | 43           | STA-1 / 66    | 50                                                       | 50                                | 2                         | JA                             |
| 1             | 44           | STA-1 / 68    | 50                                                       | 75                                | 2                         | JA                             |
| 1             | 65           | STA-1 / 100   | 50                                                       | 25                                | 3                         | JA                             |
| 4             | 25           | STA-1 / 45    | 75                                                       | 25                                | 1                         | JA                             |
| 4             | 49           | STA-1 / 71    | 75                                                       | 25                                | 2                         | NEIN                           |
| 4             | 50           | STA-1 / 73    | 75                                                       | 50                                | 2                         | NEIN                           |
| 4             | 51           | STA-1 / 76    | 75                                                       | 75                                | 2                         | JA                             |
| 5             | 108          | STA-1 / 123   | 75                                                       | 25                                | 3                         | JA                             |
| 9             | 112          | STA-1 / 127   | 100                                                      | 25                                | 1                         | NEIN                           |
| 9             | 113          | STA-1 / 128   | 100                                                      | 50                                | 1                         | JA                             |

Die Autoradiogramme Nr. 1 und 2 aus Abb. 6 zeigen bei Betrachtung mit dem unbewaffneten Auge keinerlei Untergrunddiskriminierung. Die Kombination aus Gesamtktivität, die dem Tier appliziert wurde ( $25 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-D-Glukose}$ ) und Schnittdicke des histologischen Präparates ( $25 \mu\text{m}$  bzw.  $50 \mu\text{m}$ ), ist bei der gewählten Expositionszeit von 1 Tag nicht ausreichend, eine vom Untergrund kontrastierte Schwärzung hervorzurufen. Aus diesem Grunde wurde der Bereich, in dem sich das histologische Präparat befunden haben muß, mit Filzstift markiert.

Die Autoradiogramme mit höheren Platzziffern lassen eine beginnende (Nr. 4, 7, 10) bzw. deutlich auszumachende (Nr. 12, 13, 15 ... 113) Diskriminierung des autoradiographierten Hirnes vom Untergrund erkennen.

Bei Betrachtung aller oben vorliegenden Autoradiogramme fällt weiterhin auf, daß der Untergrund trotz identischem Expositionsmodus und identischen Expositionszeiten Gradationen aufweist (Nr. 1, 2 und 4 im Vergleich zu Nr. 19, 20 und 21). Hier kommen die oben angesprochenen Effekte der Streustrahlung, positiver wie negativer Chemographie in unterschiedlich hohem Ausmaß zur Wirkung.

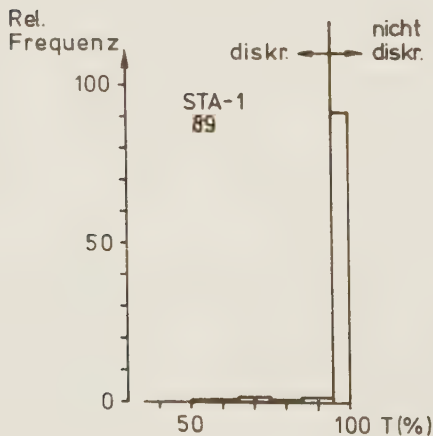
An den Autoradiogrammen werden mit dem Zeiss-Scanning-Mikroskopphotometer Absorptionsmessungen durchgeführt. Während des Meßvorganges wird in der Zeit des Zeilenrücklaufes eine dreidimensionale Darstellung der zuletzt aufgenommenen Meßwerte (Extinktion; O.D.) über Monitor dargestellt. Nach abgeschlossener Messung ist die Summe der Einzelmeßwerte auf Magnetband gespeichert und kann über das zentrale Steuerprogramm APAMOS (mit Unterprogrammen) in Verbindung mit dem PDP-12 Laborrechner für verschiedene Belange der Auswertung abgerufen werden.

Zunächst wird die Summe der Einzelmeßwerte in Form eines sogenannten Frequenzhistogrammes als Verteilungsbild wiedergegeben. Für die densitometrische Auswertung von Autoradiogrammen im Durchlicht werden hierbei alle Transmissionswerte zwischen 5% und 95% erfaßt. Je höher die prozentuale Transmission, desto niedriger ist die gemessene Extinktion im Präparat.

Die X-Achse der Frequenzhistogramme gibt die Transmission in % an, während die Y-Achse die Anzahl (n) der Einzelextinktionswerte einer bestimmten prozentualen Transmission beziffert.

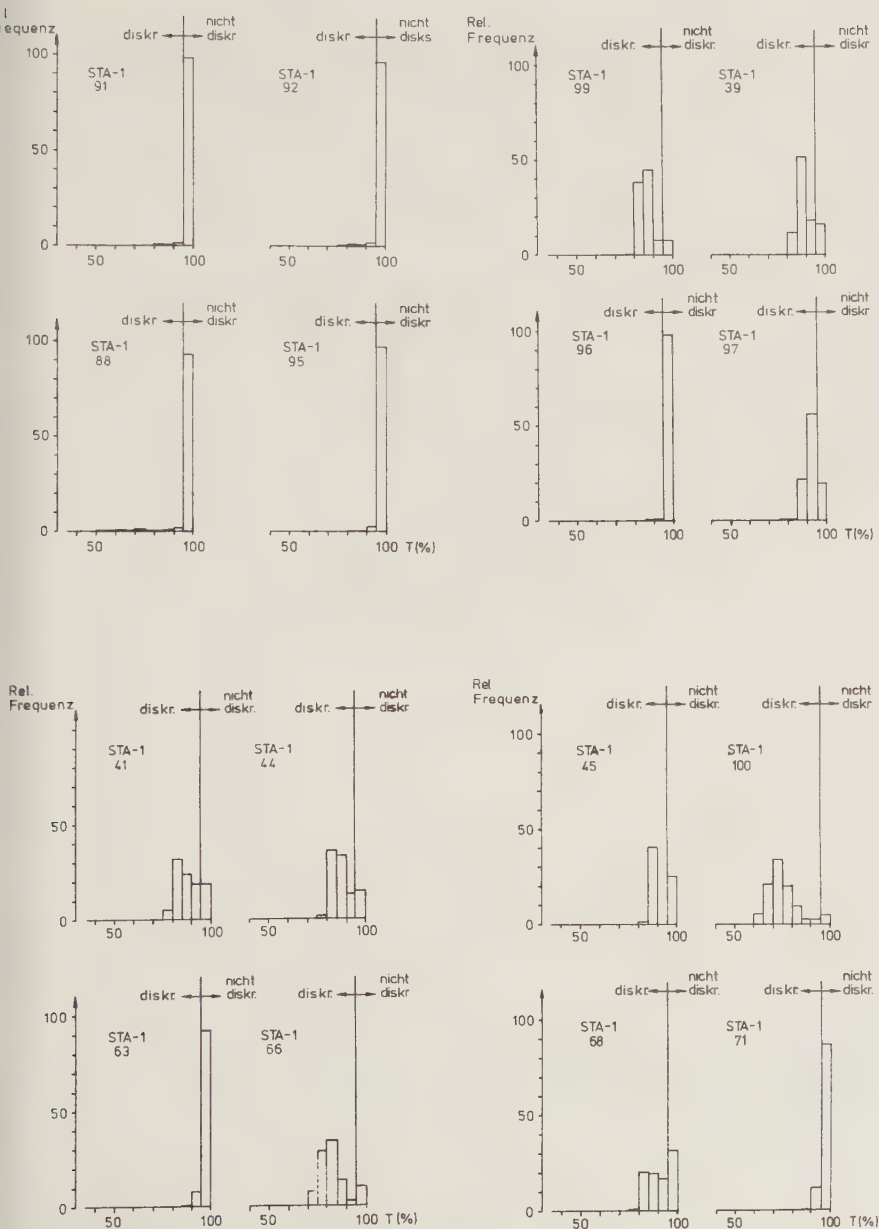
Die Abbildungen 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 zeigen die Frequenzhistogramme von diskriminierbaren im Gegensatz zu nicht diskriminierbaren Autoradiogrammen. Diskriminierbar ist ein Autoradiogramm, wenn die statistische Mehrzahl seiner Einzelextinktionen unterhalb 95% Transmission liegt. Die Diskriminationsgrenze ist in jedem Frequenzhistogramm durch einen senkrechten Strich markiert.

Abbildung 7: Frequenzhistogramm.  
Mess.-Nr.: STA-1/89.

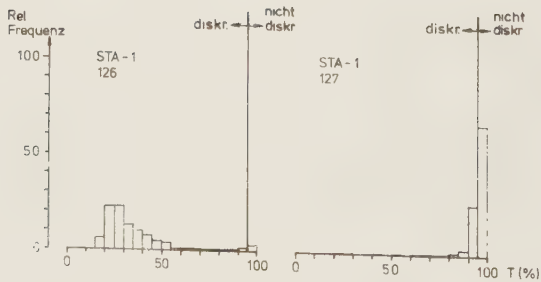
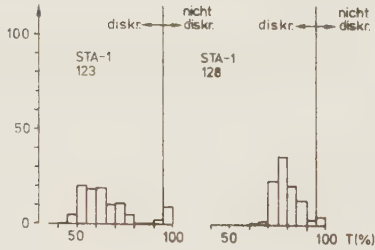
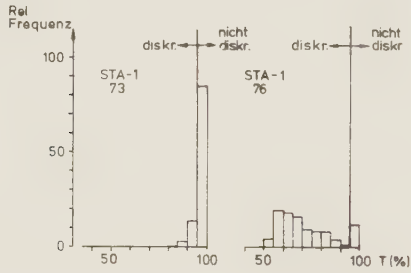


Abbildungen 8 - 11: Frequenzhistogramme.

Mess.-Nr.: STA-1/88;91;92;95;96;97;99;  
39;41;44;63;66;45;71;68;100.



Abbildungen 12 und 13: Frequenzhistogramme.  
Mess.Nr.: STA-1/73;76;123;128;126;127.



Im Rahmen des APAMOS-Unterprogrammes "PRINT DATA" besteht über einen angeschlossenen Schnelldrucker (TELETYPE) die Möglichkeit, die auf Magnetband gespeicherten Einzelmeßwerte eines abgeschlossenen Meßvorganges ausdrucken zu lassen.

Die Meßdaten werden synchron zum Original als Extinktion (Optical Density = O.D.) ausgegeben, wobei die Extinktionen als negativer dekadischer Logarithmus des eigentlichen Meßwertes - multipliziert mit dem Faktor 100 - dargestellt werden.

Aus Gründen einer besseren Übersichtlichkeit der ausgedruckten Einzelextinktionen wird über ein weiteres APAMOS-Unterprogramm (QUICKPRINT) eine geraffte Darstellung der Einzelextinktionswerte angefordert. Hierbei werden Extinktionen von 0 - 9 mit einer 0, von 10 - 19 mit einer 1, von 20 - 29 mit einer 2 usw. wiedergegeben.



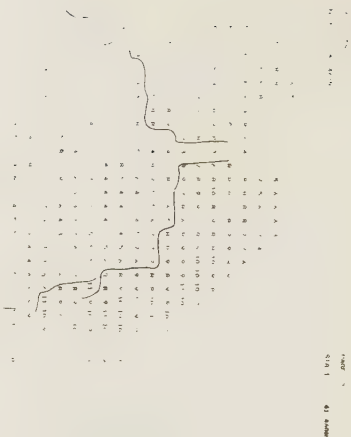
Abbildung 14:

Ausdrucke der im Autoradiogramm über  
Scanning-Mikroabsorptionsphotometrie  
erhobenen Einzelextinktionen.

$$( \text{Extinktion} = E = - \log \frac{J_0}{J} \times 100 )$$

- QUICKPRINT und ÜBERSICHTSDARSTELLUNG -

Mess.-Nr.: STA-1/39,88,97,99.



|         |           |
|---------|-----------|
| CAUTION | + 1 sec   |
| CTA     | 4: 40 sec |

[illegible]

|     |     |     |     |     |       |       |       |       |       |         |         |         |         |        |         |         |         |         |        |         |         |         |         |        |         |         |         |         |        |         |         |         |         |        |         |         |         |         |        |         |         |         |         |        |         |         |         |         |        |
|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 一、二 | 三、四 | 五、六 | 七、八 | 九、十 | 十一、十二 | 十三、十四 | 十五、十六 | 十七、十八 | 十九、二十 | 二十一、二十二 | 二十三、二十四 | 二十五、二十六 | 二十七、二十八 | 二十九、三十 | 三十一、三十二 | 三十三、三十四 | 三十五、三十六 | 三十七、三十八 | 三十九、四十 | 四十一、四十二 | 四十三、四十四 | 四十五、四十六 | 四十七、四十八 | 四十九、五十 | 五十一、五十二 | 五十三、五十四 | 五十五、五十六 | 五十七、五十八 | 五十九、六十 | 六十一、六十二 | 六十三、六十四 | 六十五、六十六 | 六十七、六十八 | 六十九、七十 | 七十一、七十二 | 七十三、七十四 | 七十五、七十六 | 七十七、七十八 | 七十九、八十 | 八十一、八十二 | 八十三、八十四 | 八十五、八十六 | 八十七、八十八 | 八十九、九十 | 九十一、九十二 | 九十三、九十四 | 九十五、九十六 | 九十七、九十八 | 九十九、一百 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|

[illegible]

1971 7514  
Q10 1 44 460M

[illegible]

0-9678-018-1

[illegible]

Abbildung 15:

Ausdrucke der im Autoradiogramm über  
Scanning-Mikroabsorptionsphotometrie  
erhobenen Einzelextinktionen.

$$( \text{Extinktion} = E = - \log \frac{J_0}{J} \times 100 )$$

- QUICKPRINT und ÜBERSICHTSDARSTELLUNG -

Mess.-Nr.: STA-1/41,44,66,68.



Abbildung 16:

Ausdrucke der im Autoradiogramm über  
Scanning-Mikroabsorptionsphotometrie  
erhobenen Einzelextinktionen.

$$( \text{Extinktion} = E = - \log \frac{J_0}{J} \times 100 )$$

- QUICKPRINT und ÜBERSICHTSDARSTELLUNG -

Mess.-Nr.: STA-1/45,71,100.



Abbildung 17:

Ausdrucke der im Autoradiogramm über  
Scanning-Mikroabsorptionsphotometrie  
erhobenen Einzelextinktionen.

$$( \text{Extinktion} = E = - \log \frac{J_0}{J} \times 100 )$$

- QUICKPRINT und ÜBERSICHTSDARSTELLUNG -

Mess.-Nr.: STA-1/73,76,123,128.

ÜBERSICHTS- und QUICKPRINT-Darstellung der Autoradiographien mit den Nummern STA-1/88,89,91,92,95 und 96 geben nur verstreut zur Darstellung gekommene Stellen höherer Silberkorndichte im Meßbereich des Präparates wieder.

Insbesondere läßt sich bemerken, daß in den Ausdrucken der Autoradiographien STA-1/88 und 89, in denen wegen fehlender Markierung des Hirnbereiches eine Trennlinie mit Filzschreiber gezogen wurde, nur diese Markierungsline als untergrunddiskriminierte Extinktion zur Darstellung kommt.

Eine Darstellung des eigentlich interessierenden Hirnbereiches verschwindet im Untergrund und kann meßtechnisch nicht erfaßt werden. Die Darstellung der Autoradiographie STA-1/97 bringt hingegen eine dem angegrenzten Meßfeld entsprechende Verteilung von Einzelextinktionen. Es darf davon ausgegangen werden, daß hier eine ausreichende Diskriminierung der interessierenden Hirnstrukturen vorliegt. Deutlicher noch kommt dieser Sachverhalt in den Ausdrucken der Autoradiographien STA-1/99,66,68,100,76,123 und 128 zur Darstellung, was sich auch in den höheren Extinktionswerten dokumentiert.

Den Ausführungen unter II.6) entsprechend ist das optisch-mathematische System der Versuchsanordnung so programmiert, daß alle außerhalb des Hirnes liegenden Objektpunkte (Untergrund) gemessen und anschließend auf 100% Transmission normiert als Äquivalent für die Extinktion des Untergrundes als individueller Bezugswert in die Messung eingehen.

Je höher also das Niveau der wiedergegebenen Einzelextinktionen ist, desto größer ist der Abstand der relativen Silberkorndichte (Schwärzung) im Bereich der Hirnstrukturen von derjenigen im Untergrund, d.h. desto genauer ist die Untergrunddiskriminierung.

Autoradiogramm STA-1/97 (25  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glukose Gesamtaktivität, 50  $\mu\text{m}$  Schnittdicke und drei Tage Expositionszeit) läßt sich diskriminieren (siehe Ausdruck), während dies bei Autoradiogramm STA-1/127 (100  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glukose, 25  $\mu\text{m}$  Schnittdicke und 1 Tag Expositionszeit) nicht der Fall ist.

Hier kommen individuelle Fehler zur Auswirkung, wie sie im einzelnen nicht vorherzusehen und daher auch nicht zu eliminieren sind.

Demnach erscheint die Behauptung unmöglich, daß ab einer bestimmten Kombination aus zugeführter  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose, Schnittdicke und Expositionszeit eine sichere Untergrunddiskriminierung vorausgesetzt werden kann.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Subsumierend läßt sich sagen, daß das nach Abschluß der Messung vom PDP-12-Rechner gelieferte Frequenzhistogramm in Verbindung mit dem Ausdruck der Einzelextinktionen eine genaue Aussage über eine mögliche Untergrunddiskriminierung zulassen.

Autoradiogramme, die aufgrund kurzer Expositionszeiten oder niedriger gewebsinkorporierter Aktivität und

Schnittdicke bzw. aufgrund individueller Fehler nur gering geschwärzt worden sind oder im Rauschen untergehen, können eliminiert werden. Bei der späteren Auswertung der Autoradiogramme werden nur solche Messungen verwertet, deren Untergrunddiskriminierung in Form eines deutlich von der Verteilung der Einzelmeßwerte abgesetzten "Background-Peaks" gegeben ist.

III.2) Autoradiographie von Standardpräparaten bekannter spezifischer Aktivität.

Berechnung der mittleren optischen Dichte (Optical Density,  $\overline{O.D.}$ ) und Korrelation von spezifischer Aktivität, Expositionszeit und  $\overline{O.D.}$ .

Die in einem Autoradiogramm nach Entwicklung und Fixierung sichtbaren Schwärzungsgrade sind mit allen ihren Gradationen ein Äquivalent für die im Präparat enthaltene Strahlungsintensität, die während der Expositionszeit zu einer Ausfällung von Silberbromidkristallen in der Photoemulsion führt.

Die Messung und damit die Zuordnung der qualitativen Grautönung zu quantitativen Daten bietet die Voraussetzung für quantitative Interpretationen von Autoradiogrammen.

Radioaktive Standardpräparate, die bekannte Mengen an  $^{14}\text{C}$  in der Volumeneinheit enthalten, werden nach erfolgter Exposition gegenüber Photoemulsionen zur Klärung der Frage herangezogen, inwieweit physikalische Gesetzmäßigkeiten in den Schwärzungsintervallen eines Autoradiogrammes enthalten sind.

Im besonderen soll ermittelt werden, ob eine Linearität zwischen der Schwärzung im Röntgenfilm (ausgedrückt als O.D. = Optical Density) und der Expositionszeit - bzw. eine lineare Abhängigkeit zwischen O.D. und der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der Standardpräparate - gefunden werden kann.

Als radioaktive Referenzquelle für eine quantitative Auswertung der Schwärzungsintensitäten im Autoradiogramm dienten standardisierte  $^{14}\text{C}$ -haltige Methylmetacrylat-Plättchen (Plättchen der Firma NEN / England).

Tabelle (4):

NEN - STANDARDS

Aufschlüsselung der spezifischen Aktivitäten ( DPM / mg ) und zugeordnete  $\beta$  - Oberflächen - Emission ( DPM / mm<sup>2</sup> )

| Nummer des Standards | Gesamtaktivität ( DPM ) | Spezifische Aktivität ( DPM / mg ) | $\beta$ - Oberflächen - Emission ( DPM / mm <sup>2</sup> ) |
|----------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 01                   | 22 00                   | 24.9 ± 1.5 %                       | 1.7                                                        |
| 02                   | 55 00                   | 57.9 ± 1.3 %                       | 2.2                                                        |
| 03                   | 11 000                  | 117 ± 1.7 %                        | 2.9                                                        |
| 04                   | 22 000                  | 238 ± 1.0 %                        | 4.4                                                        |
| 05                   | 55 000                  | 606 ± 0.9 %                        | 8.8                                                        |
| 06                   | 11 0000                 | 1185 ± 0.5 %                       | 17.2                                                       |
| 07                   | 165000                  | 1878 ± 0.5 %                       | 26.4                                                       |
| 08                   | 22 0000                 | 2479 ± 0.5 %                       | 34.3                                                       |
| 09                   | 33 0000                 | 3801 ± 0.5 %                       | 49.4                                                       |

\* Die  $\beta$  - Strahlung an der Oberfläche der Standardpräparate wurden mit einem Proportionalzählrohr bestimmt

Die Standardpräparate werden zusammen mit den histologischen Hirngewebspräparaten gegenüber Kodak-X-Omat-S Blatfilm für jeweils 1, 2 und 3 Tage lang exponiert.

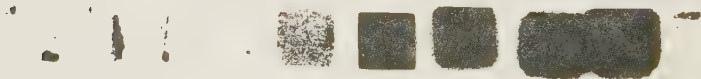
Abbildung 18: Originalautoradiographien von NEN-Standards nach 1, 2 und 3 Tagen Expositionszeit.



Expositionszeit: 1 Tag(e)



Expositionszeit: 2 Tag(e)



Expositionszeit: 3 Tag(e)

Die Autoradiogramme werden anschließend mikro-absorptionsphotometrisch vermessen. Nach Beendigung des Meß-

vorganges sind alle pro Meßfeld erhobenen Einzel-extinktionen (O.D.-Werte) auf Magnetband gespeichert. Der PDP-12-Rechner bietet nur teilweise die Möglichkeit, die Extinktionseinzelwerte bestimmter vorher determinierter Bereiche im Meßfeld aufzusummieren und anschließend zu mitteln.

Dieser Vorgang muß von Hand geschehen, indem ein interessierender Bereich von Extinktionswerten in dem vom Rechner im OFF-LINE-Betrieb über TELETYPE erstellten Ausdruck aller im Meßfeld erhobenen Extinktionen abgegrenzt wird.

- Abbildung 19 -

Darstellung der manuellen Abgrenzung von Einzel-extinktionen im Gesamtausdruck (TELETYPE) der pro Meßfeld erhobenen Daten.

|                                  |               |
|----------------------------------|---------------|
| Standard-Nr.                     | : 40          |
| Spez. $^{14}\text{C}$ -Aktivität | : 3801 DPM/mg |
| Expositionszeit                  | : 2 Tage.     |

| CARL ZEISS BONDEN 30.06.79 |                                                                      | PAGE 2 |                     |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------|---------------------|
| STA-1                      | 13 460N                                                              | STA-1  | 13 460N             |
| 4                          | 4 5 7 7 6 4 8 6 7 9 9 10 10 9 12 10 13 10 9 12 9 12 13               | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 8                          | 7 8 7 8 9 8 10 12 9 11 11 12 12 14 13 12 14 12 13 14 13 16           | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 13                         | 14 14 14 17 16 16 17 21 18 19 23 26 26 24 28 26 28 30 29 31 33       | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 33                         | 35 36 38 40 40 41 43 43 43 45 46 48 48 47 46 48 49 45 50 48          | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 49                         | 49 49 49 50 46 49 52 52 51 53 48 49 48 49 48 49 52 46 47 49 47 50    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 50                         | 50 48 50 47 49 46 50 54 53 52 48 50 48 49 48 49 50 47 50 49 50 50    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 46                         | 46 46 49 46 47 50 49 47 52 52 50 50 49 52 49 48 50 52 50 50 49 50 49 | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 52                         | 49 47 48 47 50 50 48 47 49 52 49 51 50 52 50 51 51 50 50 50 50 54    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 48                         | 50 51 50 52 50 46 47 52 51 51 51 50 49 52 54 52 53 55 55 51 50 50    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 49                         | 51 47 50 50 52 49 50 51 50 52 50 52 51 50 54 52 53 52 55 55 51       | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 50                         | 51 51 50 49 50 50 49 49 50 49 50 49 52 52 52 52 50 51 50 53 50 50    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 50                         | 52 47 48 50 49 50 50 47 51 50 50 49 50 49 52 51 51 50 49 53 53 52    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 50                         | 49 46 48 50 51 51 53 52 50 50 50 49 54 51 51 52 50 52 50 52 52       | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 52                         | 51 50 46 51 49 52 53 53 49 50 52 51 53 53 52 54 50 52 50             | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 48                         | 50 50 49 47 50 54 50 51 50 52 52 50 52 53 54 51 53 55 52             | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 51                         | 49 50 48 49 47 50 50 50 50 52 51 49 48 49 50 48 51 50 52 55          | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 52                         | 50 48 51 50 51 50 48 49 48 47 50 48 50 51 51 50 51 52 53 52 54       | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 54                         | 50 50 48 50 49 50 50 48 49 50 50 52 49 50 46 50 49 51 52 53 50 49    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 49                         | 49 50 47 50 47 50 49 47 51 49 49 51 50 50 51 52 51 51 50 52 50 50    | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 50                         | 48 49 47 47 47 47 48 52 46 52 50 50 49 51 54 53 49 50 53 49 50       | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 49                         | 47 47 52 48 47 48 50 49 50 52 52 49 47 49 52 52 49 50 49 50          | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 50                         | 50 49 54 50 49 52 53 47 50 50 50 48 47 49 50 49 50 50 50             | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |
| 49                         | 49 50 52 50 53 50 49 49 51 51 51 45 49 48 49 52 53 50 52             | 3      | 3 3 3 3 4 3 4 3 4 5 |

Eine statistische relevante Anzahl von Einzelextinktionen ( $n = 100$ ) wird mit einem Tischrechner Modell HP - 97 aufsummiert und gemittelt.

Die Standardabweichung des Mittelwertes (S.D.) gibt für jeden Bereich isoliert Auskunft über die Homogenität bzw. Inhomogenität der Silberkorndichtenverteilung. Die auf diese Art und Weise berechnete "mittlere Extinktion" ( $\overline{O.D.}$ ) ist ein für den im Autoradiogramm herausgegriffenen Bereich typischer Wert und steht in direktem Zusammenhang sowohl zu der im Präparat enthaltenen Radioaktivität bzw. zu der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der Standards als auch zu der Expositionszeit, mit der das Autoradiogramm angefertigt worden ist.

In allen Standardautoradiogrammen wird auf die beschriebene Art und Weise die "mittlere Extinktion" ( $\overline{O.D.}$ ) berechnet.

Tabelle 5 zeigt die Abhängigkeiten der berechneten mittleren Extinktionen ( $\overline{O.D.}$ ) von den unterschiedlichen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten der NEN-Standards im Verhältnis zu unterschiedlich langen Expositionszeiten.

Tabelle 5

Darstellung der mikroabsorptionsphotometrisch gemessenen  $\overline{\text{O.D.}}$   
(Schwärzung) von Autoradiogrammen der NEN-Standards.

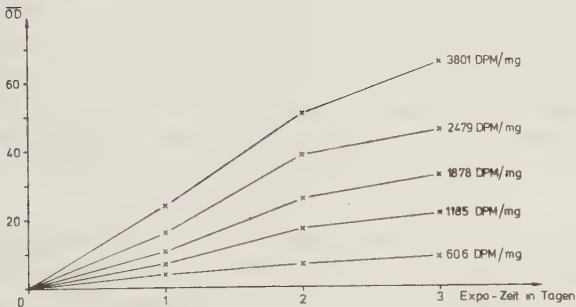
Expositionszeiten: 1, 2 und 3 Tage

|      | Standard<br>Nummer | Spezifische<br>Aktivität | Mess. - Nummer<br>d. Autoradiogr. | Expozeit | Anzahl der<br>Meßpunkte | $\overline{\text{O.D.}}$ | $\pm$ S. D. |
|------|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------|-------------------------|--------------------------|-------------|
| (17) | 9                  | 3801                     | STA-1 / 8                         | 1        | 100                     | 26, 82                   | 1, 42       |
|      | 8                  | 2479                     | STA-1 / 9                         | 1        | 100                     | 18, 87                   | 1, 50       |
|      | 7                  | 1878                     | STA-1 / 10                        | 1        | 100                     | 12, 92                   | 1, 19       |
|      | 6                  | 1185                     | STA-1 / 11                        | 1        | 100                     | 7, 86                    | 0, 70       |
|      | 5                  | 606                      | STA-1 / 12                        | 1        | 100                     | 4, 37                    | 1, 13       |
| (5)  | 9                  | 3801                     | STA-1 / 22                        | 1        | 100                     | 21, 09                   | 2, 22       |
|      | 8                  | 2479                     | STA-1 / 23                        | 1        | 100                     | 15, 48                   | 0, 86       |
|      | 7                  | 1878                     | STA-1 / 24                        | 1        | 100                     | 9, 11                    | 0, 86       |
|      | 6                  | 1185                     | STA-1 / 25                        | 1        | 100                     | 6, 33                    | 0, 71       |
| (40) | 9                  | 3801                     | STA-1 / 13                        | 2        | 100                     | 50, 51                   | 1, 78       |
|      | 8                  | 2479                     | STA-1 / 14                        | 2        | 100                     | 38, 88                   | 1, 47       |
|      | 7                  | 1878                     | STA-1 / 15                        | 2        | 100                     | 26, 15                   | 2, 09       |
|      | 6                  | 1185                     | STA-1 / 16                        | 2        | 100                     | 17, 05                   | 1, 22       |
|      | 5                  | 606                      | STA-1 / 17                        | 2        | 100                     | 6, 31                    | 0, 76       |
| (41) | 9                  | 3801                     | STA-1 / 18                        | 2        | 100                     | 47, 91                   | 1, 62       |
|      | 8                  | 2479                     | STA-1 / 19                        | 2        | 100                     | 36, 63                   | 1, 53       |
|      | 7                  | 1878                     | STA-1 / 20                        | 2        | 100                     | 13, 72                   | 1, 20       |
|      | 6                  | 1185                     | STA-1 / 21                        | 2        | 100                     | 4, 29                    | 1, 54       |
| (11) | 9                  | 3801                     | STA-1 / 27                        | 3        | 100                     | 66, 76                   | 1, 59       |
|      | 8                  | 2479                     | STA-1 / 28                        | 3        | 100                     | 47, 69                   | 1, 57       |
|      | 7                  | 1878                     | STA-1 / 29                        | 3        | 100                     | 33, 84                   | 2, 94       |
|      | 6                  | 1185                     | STA-1 / 30                        | 3        | 100                     | 20, 15                   | 0, 87       |
|      | 5                  | 606                      | STA-1 / 31                        | 3        | 100                     | 8, 85                    | 1, 60       |
| (64) | 9                  | 3801                     | STA-1 / 32                        | 3        | 100                     | 66, 53                   | 2, 21       |
|      | 8                  | 2479                     | STA-1 / 33                        | 3        | 200                     | 44, 10                   | 4, 13       |
|      | 7                  | 1878                     | STA-1 / 34                        | 3        | 200                     | 32, 12                   | 1, 27       |
|      | 6                  | 1185                     | STA-1 / 35                        | 3        | 200                     | 21, 14                   | 1, 61       |
|      | 5                  | 606                      | STA-1 / 36                        | 3        | 200                     | 8, 30                    | 2, 30       |

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß die mittleren Extinktionen ( $\overline{O.D.}$ ) sowohl mit steigender spezifischer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der Standards als auch mit steigender Expositionszeit ein höheres Niveau erreichen.

Die geringen Standardabweichungen (S.D.) der  $\overline{O.D.}$ -Werte in den vermessenen Autoradiogrammen zeigen die "Homogenität" bezüglich der  $^{14}\text{C}$ -Markierung der Standards und der Silberkorndichtenverteilung (Filmschwärzung) im fertigen Autoradiogramm an. Entsprechend der Fragestellung dieses Kapitels werden nun die berechneten mittleren Extinktionen ( $\overline{O.D.}$ ) in Beziehung zur Expositionszeit der Standards gegenüber der Photoemulsion gesetzt.

Abbildung 20: Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) von NEN-Standards mit steigenden spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten zur Expositionszeit.



Für die in Abbildung 2o dargestellten Kurvenverläufe wurden die Regressionsgeraden ( $y = a + bx$ ) und die Regressionskoeffizienten für eine lineare Regression ( $r^2$ ) berechnet. Es betrugen im einzelnen:

für 606 DPM/mg  $y = 2,19 + 2,12 x$  und  $r^2 = 0,99$   
für 1185 DPM/mg  $y = 0,96 + 6,78 x$  und  $r^2 = 0,95$   
für 1878 DPM/mg  $y = 0,86 + 10,98 x$  und  $r^2 = 0,96$   
für 2479 DPM/mg  $y = 24,19 + 7,35 x$  und  $r^2 = 0,05$   $r=0.97$  (log.  
für 3801 DPM/mg  $y = 3,65 + 21,35 x$  und  $r^2 = 0,98$  Regression)

Es darf bei Regressionskoeffizienten von  $r^2$  zwischen 0,99 und 0,95 für den Bereich von spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten von 606 DPM/mg bis zu 1878 DPM/mg davon ausgegangen werden, daß die mittlere Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) linear zu der Expositionszeit korreliert ist.

Für höhere spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten (2479 DPM/mg) weicht der Kurvenverlauf von der für geringere spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten belegten Linearität ab und nähert sich besonders bei langen Expositionszeiten (drei Tage) einer logarithmischen Korrelation an. Für 2479 DPM/mg -  $r^2 = 0,05$  und  $r = 0,97$  (Korrelationskoeffizient für eine logarithmische Korrelation).

Eine Antwort auf dieses Verhalten ist in den physikalischen Parametern der Photoemulsion zu suchen, die besonders bei hohen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten des autoradiographierten Präparates und langen Expositionszeiten Sättigungserscheinungen unterliegt.

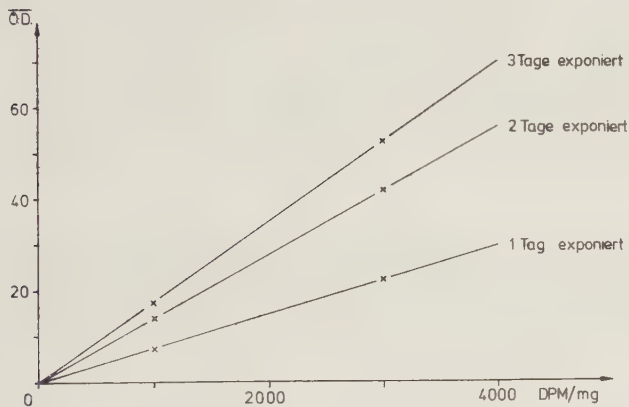
Dieser Umstand (Sättigung der Photoemulsion) bedingt, daß bei hohen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten und langer Expositionszeit die mikro-absorptionsphotometrisch

gemessene Zunahme der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) über die Zeit nicht linear erfolgt.

Weiterhin soll versucht werden, eine Zuordnung der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu der im Standard enthaltenen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität (DPM/mg) aufzustellen.

Abbildung 21: Korrelation der mikro-absorptions-photometrisch gemessenen  $\overline{O.D.}$  zur spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der Standards (DPM/mg).

Expositionszeiten: jeweils 1, 2 und 3 Tage.



Auch für die in Abbildung 21 dargestellten Kurvenverläufe wurden die Regressionsgeraden ( $y = a + bx$ ) und die Regressionskoeffizienten für eine lineare Regression ( $r^2$ ) berechnet.

Es betragen im einzelnen:

für 1 Tag Expositionszeit:  $y = - 0,19 + 0,01 x$  und  $r^2 = 0,99$   
für 2 Tage Expositionszeit:  $y = - 0,01 + 0,01 x$  und  $r^2 = 0,98$   
für 3 Tage Expositionszeit:  $y = - 1,47 + 0,02 x$  und  $r^2 = 1,00$ .

Bei berechneten Regressionskoeffizienten von  $r^2$  zwischen 0,98 und 1,00 darf auch für die Beziehung zwischen mittlerer Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) und spezifischer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität (DPM/mg) der Standards eine lineare Korrelation für die betreffenden Expositionszeiten angenommen werden.

Prinzipiell läßt sich sagen, daß mit Zunahme der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der  $^{14}\text{C}$ -haltigen Standards bei konstanter Expositionszeit auch die Anzahl der entwickelbar gewordenen Silberbromidkristalle und damit die gemessene mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) linear ansteigt.

Die oben experimentell dargestellten Abhängigkeiten gelten jedoch nicht uneingeschränkt für den gesamten Meßbereich.

Folgende Werte wurden aus dem Kurvenverlauf von  
Abbildung 21 extrapoliert:

| Spezifische Aktivität des<br>NEN - Standards<br>( DPM/mg ) | Expositionszeit<br>( Tage ) | Mittlere<br>Extinktion<br>( $\overline{O.D.}$ ) |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|
| 3000                                                       | 1                           | 22,5                                            |
| 3000                                                       | 2                           | 41,5                                            |
| 3000                                                       | 3                           | 52,5                                            |

Während eine Zunahme der mittleren Extinktionen vom ersten auf den zweiten Tag noch annähernd den doppelten Betrag des Ausgangswertes für einen Tag Expositionszeit ausmacht, so fällt diese Extinktionszunahme vom zweiten auf den dritten Tag hin deutlich ab.

Diese Tatsache dokumentiert, daß auch in dieser Darstellung bei langen Expositionszeiten Sättigungserscheinungen der Photoemulsion zum Tragen kommen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Schlußfolgernd aus den oben dargestellten experimentellen Untersuchungen darf festgehalten werden, daß die gemessene mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) linear von der Größe der lichtundurchlässigen Objektfläche abhängt, die bei den hier vorliegenden Autoradiogrammen durch die Summe aller optisch wirksamen Querschnitte der Silbergranula gebildet wird.

Diese Linearität gilt sowohl für das Verhältnis der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme als auch für die Korrelation von Schwärzung ( $\overline{O.D.}$ ) zu der spezifischen Aktivität (DPM/mg) der NEN-Standards bei konstanten Expositionszeiten.

Die physikalischen Eigenschaften der Photoemulsion (Sättigungserscheinungen) sind bei einer späteren Quantifizierung der im Autoradiogramm enthaltenen Information in dem Sinne zu beachten, daß Auswertungen nur im linearen Bereich der Korrelationen erfolgen.

Die oben experimentell ermittelten linearen Abhängigkeiten bieten die Grundlage für die folgenden quantitativen Betrachtungen der lokalen  $^{14}\text{C}$ -D-Glukoseverteilung im Rattenhirn über Autoradiographie.

Sie belegen gleichermaßen, daß in diesem speziellen Falle auf eine Auszählung der Silberkörner pro Flächeneinheit im entwickelten Autoradiogramm für eine quantitative Auswertung von Autoradiogrammen verzichtet werden kann.

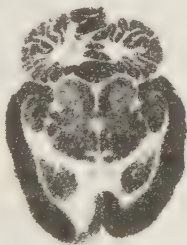
III.3) Autoradiographie von histologischen Präparaten  
des Rattenhirnes unbekannter spezifischer  
 $^{14}\text{C}$ -Aktivität; Berechnung der mittleren Ex-  
tinktionen ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) für Rinde und Mark.

Die vorliegende Teiluntersuchung soll klären, inwieweit die morphologisch in einem Schnitt des Rattenhirnes zu diskriminierenden Bereiche von Rinde und Mark eine Korrelation in unterschiedlichen Schwärzungsintensitäten des Autoradiogrammes finden.

Abbildung 22:

Autoradiogramm eines Hirnschnittes von 100  $\mu\text{m}$  Schnittdicke. Die dem Tier applizierte Gesamtaktivität betrug 50  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glukose.

(Abb. ist auf 200% Originalgröße vergrößert).



Bei Betrachtung des Autoradiogrammes mit unbewaffnetem Auge lassen sich Bereiche höherer Silberkorndichteverteilung (Schwärzung) von solchen niedrigerer Schwärzung unterscheiden.

Ein anschließender Vergleich mit dem autoradiographierten histologischen Präparat (Hirnschnitt) läßt erkennen, daß sich Hirnrindenbereiche im Autoradiogramm intensiver geschwärzt darstellen als solche Flächen im Autoradiogramm, die eindeutig Markanteilen zugeordnet werden können.

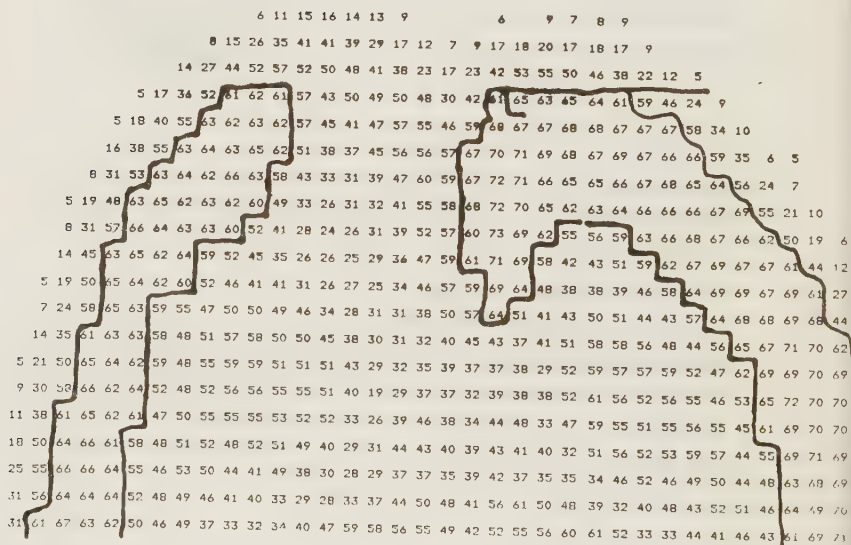
Nach erfolgter mikro-absorptionsphotometrischer Vermessung des Autoradiogrammes (die Meßblende des Photometers wurde so eingestellt, daß sicher Rinden- und Markanteile im Autoradiogramm von der Messung erfaßt wurden) liefert der über TELETYPE im OFF-LINE-Betrieb erstellte Ausdruck aller im Meßbereich erfaßten Einzelextinktionen die Grundlage für die Abgrenzung korrespondierender Extinktionen im Rinden- und Markanteil des Autoradiogrammes.

Abbildung 23: Darstellung des vom PDP-12-Rechner erstellten Datenbildes; es werden alle im Meßbereich liegenden Einzelextinktionen wiedergegeben.

Autoradiogramm Nummer : 165  
 Gesamtaktivität <sup>14</sup>C-D-Glukose : 50 µCi  
 Schnittdicke : 100 µm  
 Expositionszeit : 3 Tage  
 Mess.Nr. : STA-1/177

CARL ZEISS JENÄ 6.7.79

STA-1 177 460N



Im vorliegenden Ausdruck von Einzelextinktionen können Flächen mit höheren Extinktionen von solche mit niedrigeren Extinktionen abgegrenzt werden. Damit ist der Beweis erbracht, daß über die Absorptionsphotometrie eine Differenzierung von Hirnautoradiogrammen in Bereiche mit höheren Extinktionen (Rinde) und solche mit niedrigeren Extinktionen (Mark) getroffen werden kann.

Aus beiden Bereichen wird nunmehr eine statistisch relevante Zahl von Einzelextinktionen ( $n \geq 100$ ) herausgegriffen und mit einem HP - 97 Tischrechner aufsummiert. Die Mittelwerte und die Standardabweichung des Mittelwertes (S.D.) werden berechnet.

Tabelle (15):

Berechnung der "mittleren Extinktion" ( $\overline{O.D.}$ ) für die interessierenden Bereiche des oben dargestellten Autoradiogramms

| Hirn<br>Nr. | Messreihe<br>Nr. | Aktivität<br>(Ci) | Schnittdicke<br>( $\mu m$ ) | Expozeit<br>Tage | Rinde $\overline{O.D.}$        |                         | Mark $\overline{O.D.}$         |                |            |
|-------------|------------------|-------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------|------------|
|             |                  |                   |                             |                  | Anzahl der<br>Einzelextinktion | $\overline{x} \pm S.D.$ | Anzahl der<br>Einzelextinktion | $\overline{x}$ | $\pm S.D.$ |
| 165         | STA -1/177       | 50                | 100                         | 3                | 312                            | 54,9 15,11              | 251                            | 44,9           | 10         |

Fernerhin sollte belegt werden, daß eine erhöhte mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) in den Rindenanteilen gegenüber einer erniedrigten mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) in Markanteilen ein allgemeingültiges und somit charakteristisches Merkmal von Hirnautoradiogrammen ist.

Zu diesem Zweck wurden die Hirne von unterschiedlichen Tieren mit unterschiedlich hoch applizierter Gesamtaktivität (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glukose) zu Gefrierschnitten unterschiedlicher Schnittdicke (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ) verarbeitet.

Die histologischen Präparate wurden für unterschiedliche Zeiten (1, 2 und 3 Tage) gegenüber der Photoemulsion exponiert.

Die fertigen Autoradiogramme wurden im Durchlicht photometriert und in der oben beschriebenen Weise die mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) jeweils für Rinde und Mark berechnet.

Tabelle 7

zeigt einen Vergleich der mittleren  
Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) von Rinde und Mark  
in unterschiedlich spezifizierten  
Hirnautoradiogrammen.

Gesamtaktivität : 25 - 100  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -D-Glukose

Schnittdicke : 25 - 100  $\mu\text{m}$

Expositionszeit : 1 - 3 Tage.

Tabelle (7)

| Autoradiogramm<br>Nummer |              |              | Aktivität<br>$\mu\text{Ci}$ | Schnittdicke<br>$\mu\text{m}$ | CORTEX<br>Expozeiten |              |              | MARK<br>Expozeiten |              |              |
|--------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|
| 24 h                     | 48 h         | 72 h         |                             |                               | 24 h                 | 48 h         | 72 h         | 24 h               | 48 h         | 72 h         |
| OD. $\pm$ SD             | OD. $\pm$ SD | OD. $\pm$ SD |                             |                               | OD. $\pm$ SD         | OD. $\pm$ SD | OD. $\pm$ SD | OD. $\pm$ SD       | OD. $\pm$ SD | OD. $\pm$ SD |
| 115                      | 119          | 123          | 100                         | 100                           | 21 3                 | 39 4         | 72 8         | 17 7               | 29 8         | 56 11        |
|                          | 118          | 122          | 100                         | 75                            |                      | 26 3         | 56 4         |                    | 15 2         | 43 6         |
|                          |              | 75           | 100                         | 75                            |                      |              | 20 2         |                    |              | 17 3         |
| 113                      | 117          | 121          | 100                         | 50                            | 13 2                 | 26 3         | 45 5         | 8 2                | 17 5         | 30 7         |
|                          |              | 74           | 100                         | 50                            |                      |              | 22 5         |                    |              | 17 3         |
|                          | 116          | 120          | 100                         | 25                            |                      | 14 2         | 27 3         |                    | 8 2          | 17 3         |
| 103                      | 107          | 111          | 75                          | 100                           | 5 2                  | 44 5         | 62 8         | 4 1                | 28 9         | 49 11        |
| 28                       | 52           | 72           | 75                          | 100                           | 14 3                 | 23 4         | 60 6         | 10 3               | 16 3         | 50 10        |
| S32                      | S56          |              | 75                          | 100                           | 16 2                 | 24 3         |              | 11 3               | 15 3         |              |
| 102                      | 106          | 110          | 75                          | 75                            | 14 2                 | 41 2         | 59 5         | 9 3                | 30 6         | 37 7         |
| 27                       | 51           | 71           | 75                          | 75                            | 13 3                 | 23 2         | 57 3         | 8 1                | 14 5         | 43 7         |
| S31                      | S55          |              | 75                          | 75                            | 12 2                 | 23 4         |              | 10 3               | 14 3         |              |
| 101                      | 105          | 109          | 75                          | 50                            | 6 1                  | 28 4         | 46 6         | 4 1                | 17 8         | 29 8         |
| 26                       |              | 70           | 75                          | 50                            | 9 2                  |              | 44 3         | 7 2                |              | 31 8         |
| S30                      | S54          |              | 75                          | 50                            | 8 1                  | 14 3         |              | 5 1                | 7 2          |              |
| 100                      | 104          | 108          | 75                          | 25                            | 4 2                  | 22 1         | 29 7         |                    | 16 2         | 16 5         |
| 25                       |              | 69           | 75                          | 25                            | 6 2                  |              | 26 3         | 5 1                |              | 17 4         |
| 21                       | 45           | 68           | 50                          | 100                           | 8 1                  | 11 1         | 33 5         | 6 1                | 6 5          | 22 5         |
| 20                       | 44           | 67           | 50                          | 75                            | 8 1                  | 7 1          | 34 3         | 5 2                | 5 1          | 22 6         |
| S24                      | S48          |              | 50                          | 75                            | 5 1                  | 12 2         |              | 4 1                | 6 2          |              |
| 19                       | 43           | 66           | 50                          | 50                            | 6 1                  | 10 3         | 22 4         | 5 1                | 8 2          | 16 4         |
|                          | S47          |              | 50                          | 50                            |                      | 8 2          |              |                    | 5 1          |              |
|                          | S46          | 65           | 50                          | 25                            |                      | 8 2          | 17 2         |                    | 5 2          | 11 3         |
|                          |              | 15           | 25                          | 100                           |                      |              | 7 1          |                    |              | 6 1          |
|                          |              | 14           | 25                          | 75                            |                      |              | 6 1          |                    |              | 5 1          |
|                          |              | 13           | 25                          | 50                            |                      |              | 4 1          |                    |              | 4 1          |

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß die mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Rindenbereich jeweils höher gelegen ist als die korrespondierende mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) für den Markbereich.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen haben ergeben,

- 1.- daß eine Abgrenzung von Rinde und Mark in Hirnautoradiogrammen von Ratten mit Hilfe der Mikro-Absorptionsphotometrie getroffen werden kann. Rindenbereiche kommen im Verhältnis zu Markbereichen stärker geschwärzt zur Darstellung und weisen auch eine höhere mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) auf.
- 2.- Dieser Sachverhalt ist ein von unterschiedlichen Versuchstieren, Gesamtaktivitäten an  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ , Schnittdicken und Expositionszeiten unabhängiges Charakteristikum von Hirnautoradiogrammen.
- 3.- Die berechnete mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) ist ein für Rinde und Mark typischer Wert und steht in direktem Zusammenhang zur gewebesinkorporierten Aktivität an  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ . Sie kann somit als Parameter für die jeweilige Stoffwechselleistung herangezogen werden.

### III.4) Bestimmung der spezifischen $^{14}\text{C}$ -Aktivität.

Um den Grad der Schwärzung im Autoradiogramm mit der  $^{14}\text{C}$ -Zerfallrate der Standardpräparate (Abschnitt III.2) vergleichen zu können, ist die Bestimmung der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Gewebeschnitt erforderlich.

Unter spezifischer Aktivität versteht man die Anzahl der Zerfälle pro Gewichtseinheit.

$$\text{SPEZIFISCHE AKTIVITÄT} = \frac{\text{DESINTEGRATIONS PER MINUTE (DPM)}}{\text{mg}}$$

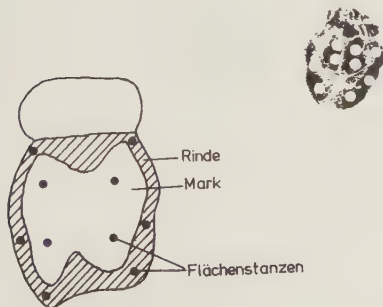
( SPECIFIC ACTIVITY )

Diese Werte werden aus den vorliegenden Hirngewebschnitten unterschiedlicher Schnittdicke über "Flächenstanzen" gewonnen.

Dazu werden zunächst aus Mark- und Rindenbereichen der Hirnschnitte jeweils 4 - 6 Gewebsflächen ( $2,54 \text{ mm}^2$ ) ausgestanzt und gewogen. Anschließend werden diese Stanzen in Hyamin gelöst; die tatsächliche  $^{14}\text{C}$ -Zerfallsrate (DPM) wird im Flüssigkeitsszintillationszähler nach einer Quenchkorrektur bestimmt.

Abbildung 24: Histologisches Präparat eines Hirnschnittes nach Flächenstanzung. Schematische Darstellung der Flächenstanzung.

Hirn Nummer: 4                      Schnittdicke: 75  $\mu\text{m}$   
Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose : 75  $\mu\text{Ci}$



Die Abbildung zeigt einen gefriergetrockneten Schnitt des Rattenhirnes mit einer Vitalschnittdicke von 75  $\mu\text{m}$ . Die Aussparungen entsprechen den entnommenen Flächenstanzen aus Rinde und Mark.

Durch Autoradiographie der Hirnschnitte vor und nach der Stanzung ist über anschließende Extinktionsmessungen korrespondierender Bereiche in beiden Autoradiogrammen die Möglichkeit gegeben, eine gute Korrelation zwischen gewebsinkorporierter Absolutaktivität (Flüssigkeitsszintillationszählung der  $^{14}\text{C}$ -Zerfallsrate pro Flächenstanze Hirn) und der Schwärzung im Autoradiogramm (Mikro-Absorptionsphotometrie; Berechnung der mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ )) zu erhalten.

Weiterhin kann die Validität der Absorptionsmessung durch den Vergleich korrespondierender Extinktionen in beiden Autoradiogrammen (die ja vom gleichen histologischen Präparat stammen) überprüft werden.

Abbildung 25: Autoradiogramme eines Hirnschnittes vor und nach der Flächenstanzung.

Hirn Nummer: 4                      Schnittdicke: 75  $\mu\text{m}$   
Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose : 75  $\mu\text{Ci}$   
Expositionszeit: 2 Tage



Die in engen Grenzen vor und nach der Stanzung nur unwesentlich voneinander differierenden Werte für die mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) sowohl im Rinden- als auch im Markbereich des Autoradiogrammes belegen die Validität der mikro-absorptionsphoto-metrisch erhobenen Meßwerte.

Tabelle (8):

Mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) von Autoradiogrammen eines Himschnittes vor und nach erfolgter Flächenstanzung

| Hirn Nummer | Mess Nummer     | Gesamtaktivität<br>( $\mu\text{Ci}$ ) | Schnitt-<br>dicke<br>( $\mu\text{m}$ ) | Expositions-<br>zeit<br>(Tage) | CORTEX                                |                                                               | MARK    |                                       |                                                               |                           |
|-------------|-----------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------|
|             |                 |                                       |                                        |                                | Anzahl der<br>Einzelextinktion<br>( ) | $\overline{O.D.}$<br>mittlere<br>Extinktion<br>$\overline{X}$ | $\pm S$ | Anzahl der<br>Einzelextinktion<br>( ) | $\overline{O.D.}$<br>mittlere<br>Extinktion<br>$\overline{X}$ | $\pm S$                   |
| 4<br>51     | STA-<br>1<br>76 | 75                                    | 75                                     | 2                              | 100                                   | 23,37                                                         | 1,86    | 100                                   | 13,51                                                         | 4,84                      |
|             |                 |                                       |                                        |                                |                                       |                                                               |         |                                       |                                                               | vor Flächen-<br>stanzung  |
| 4<br>55     | STA-<br>1<br>77 | 75                                    | 75                                     | 2                              | 113                                   | 23,46                                                         | 4,12    | 100                                   | 13,58                                                         | 3,30                      |
|             |                 |                                       |                                        |                                |                                       |                                                               |         |                                       |                                                               | nach Flächen-<br>stanzung |

Die für die Ermittlung der spezifischen Aktivität notwendigen Gewichte der Flächenstanzen aus Hirnschnitten unterschiedlicher Schnittdicke wurden mit einer METTLER-Analysenwaage vorgenommen.

Zunächst sollte ermittelt werden, in welchen Grenzen die Wägung derart geringer Substanzgewichte, wie sie von der Größe der Flächenstanzen her zu erwarten war ( $2,54 \text{ mm}^2$ ), technischen Einflüssen unterworfen ist.

Aus diesem Grunde wurden Flächenstanzen aus Hirngewebschnitten verschiedener Hirne mit einheitlicher Schnittdicke ( $75 \text{ }\mu\text{m}$ ) gewogen.

Das Gewicht von Flächenstanzen aus dem Untergrund (PVC-Folie, auf welche der Hirnschnitt aufgezogen ist) wurde ebenfalls ermittelt und zur Berechnung des Taragewichtes herangezogen. Das Taragewicht ist hierbei das Gewicht an reiner Hirnsubstanz auf einer Flächenstanze.

Tabelle 9: Zusammenstellung der Ergebnisse der Wägung von Flächenstanzen aus Hirnschnitten unterschiedlicher Hirne und identischer Schnittdicke. Aus jedem Hirnschnitt wurden jeweils 6 Stenzen aus dem Rindenbereich und 4 Stenzen aus dem Markbereich sowie 2 Leerstanzen entnommen und gewogen.

| nr | Schnitt-<br>dicke<br>(µm) | Gesamt-<br>aktivität<br>(µCi) | Gewicht der Hirnstanzen (10 <sup>-3</sup> g) |       |       |       |       |       | Gewicht der Hirnstanzen (10 <sup>-3</sup> g) |       |       |       | Leerstanzen |       | $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ | ± S.D. |
|----|---------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------------|-------|----------------------------------------|--------|
|    |                           |                               | Idd. Nummer der Stanzen                      |       |       |       |       |       | Idd. Nummer der Stanzen                      |       |       |       |             |       |                                        |        |
|    |                           |                               | 1                                            | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7                                            | 8     | 9     | 10    | 11          | 12    |                                        |        |
|    | 75                        | 25                            | 0.213                                        | 0.208 | 0.232 | 0.246 | 0.225 | 0.212 | 0.200                                        | 0.231 | 0.224 | 0.215 | 0.205       | 0.192 | 0.220                                  | 0.07   |
|    | 75                        | 25                            | 0.244                                        | 0.230 | 0.263 | 0.215 | 0.245 | 0.245 | 0.255                                        | 0.248 | 0.255 | 0.257 | 0.215       | 0.215 | 0.250                                  | 0.01   |
|    | 75                        | 50                            | 0.235                                        | 0.225 | 0.220 | 0.228 | 0.230 | 0.240 | 0.226                                        | 0.225 | 0.243 | 0.225 | 0.190       | 0.200 | 0.230                                  | 0.01   |
|    | 75                        | 50                            | 0.230                                        | 0.235 | 0.230 | 0.250 | 0.248 | 0.245 | 0.239                                        | 0.271 | 0.236 | 0.252 | 0.225       | 0.200 | 0.240                                  | 0.01   |
|    | 75                        | 100                           | 0.224                                        | 0.247 | 0.230 | 0.222 | 0.247 | 0.225 | 0.251                                        | 0.250 | 0.252 | 0.243 | 0.200       | 0.211 | 0.240                                  | 0.01   |
|    | 75                        | 100                           | 0.242                                        | 0.250 | 0.245 | 0.220 | 0.244 | 0.244 | 0.254                                        | 0.275 | 0.250 | 0.235 | 0.215       | 0.215 | 0.250                                  | 0.01   |

Die Mittelung aller Stenzen ergibt folgendes Gewicht:

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{14,237}{60} = 0,237 \times 10^{-3} \text{ g}$$

Die Mittelung aller Leerstanzen (Folie ohne Hirn) ergibt:

$$\bar{x}_2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{2.483}{12} = \underline{0,207 \times 10^{-3} \text{g}}$$

Nach Substraktion des Leerwertes von den Stanzgewichten erhält man das reine mittlere Hirngewicht (Taragewicht) pro Flächenstanze mit:

$$\begin{aligned} \bar{x}_1 - \bar{x}_2 &= \bar{x}_3 = 0,237 \times 10^{-3} \text{g} - 0,207 \times 10^{-3} \text{g} \\ &= \underline{0,03 \times 10^{-3} \text{g}} \end{aligned}$$

Die Analyse der in oben aufgeführter Tabelle zusammengestellten Wägeergebnisse belegt bei Standardabweichungen des Mittelwertes (S.D.) von  $\pm 0,01 \times 10^{-3} \text{g}$  für das mittlere Gewicht von 10 Stanzen pro Hirnschnitt eine ausreichende Wägegenauigkeit des Verfahrens.

Es bleibt an dieser Stelle noch zu bemerken, daß das mittlere Gewicht der Flächenstanzen mit zunehmender Wägedauer ansteigt.

Die Stanzen aus Hirn Nummer 1 wurden zu Beginn des Versuches gewogen. Das mittlere Gewicht betrug  $0,220 \times 10^{-3} \text{g}$ . Die Stanzen von Hirn Nummer 10 wurden am Schluß des Versuches gewogen (ca.  $2 \frac{1}{2}$  Stunden später). Das mittlere Gewicht betrug nunmehr  $0,250 \times 10^{-3} \text{g}$ .

Die Tatsache, daß zur späteren autoradiographischen Auswertung nicht nur Schnitte mit 75 µm Schnittdicke herangezogen wurden, machte einen Analogversuch zur Ermittlung der Hirngewichte auf Stanzen von Schnitten oben genannter Spezifikation erforderlich.

Tabelle 10: Mittlere Gewichte von Flächenstanzen aus Hirnschnitten mit 25, 50, 75 und 100 µm Schnittdicke

| Schnittdicke des Hirnschnittes<br>( µm ) | mittleres Gewicht einer Stanze<br>( 10 <sup>-3</sup> g ) |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 25                                       | 0,2355                                                   |
| 50                                       | 0,2372                                                   |
| 75                                       | 0,2494                                                   |
| 100                                      | 0,2750                                                   |

Das mittlere Gewicht einer Leerstanze betrug:

$$\bar{x}_L = 0,2085 \times 10^{-3} \text{g}$$

Nach Substraktion der Leerwerte ergeben sich folgende mittlere Gewichte an reiner Hirnsubstanz in Abhängigkeit von der Schnittdicke der gestanzten Hirnschnitte:

Tabelle (11):

Darstellung des mittleren Gewichts an reiner Hirnsubstanz auf einer Flächenstanze in Abhängigkeit von der Schnittdicke des gestanzten Hirnschnittes

| Schnittdicke der gestanzten<br>Hirnschnitte<br>( Mikrometer ) | mittleres Gewicht an reiner Hirnsubstanz auf<br>einer Flächenstanze<br>( $10^{-3}g$ ) |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 25                                                            | 0,027                                                                                 |
| 50                                                            | 0,029                                                                                 |
| 75                                                            | 0,041                                                                                 |
| 100                                                           | 0,067                                                                                 |

Das Gewicht der Flächenstanzen läßt sich nicht nur durch Auswägen, sondern auch rechnerisch bestimmen.

Das Volumen (V) ergibt sich bei einem Durchmesser der Stanznadel von 1,88 mm nach Gleichung 1 für entsprechende Schnittdicke zu:

Gleichung 1:  $V = A \times h$   
 $A = \text{Fläche der Stanze} = 0,025 \text{ cm}^2$   
 $h = \text{Schnittdicke der gestanzten Hirnschnitte} = 25, 50, 75 \text{ und } 100 \mu\text{m}.$

Wenn man die Dichte des biologischen Gewebes (Hirnschnitt) mit 1 ansetzt, so ergeben sich die in Spalte 2 der unten abgebildeten Tabelle genannten abgerundeten Gewichte. Berücksichtigt man den Wassergehalt der Rinde mit 88% und den des Markes mit 68%, so ersieht man, daß die experimentell ermittelten Gewichte (Spalte 4 der Tabelle) innerhalb der hier zu berücksichtigenden Fehlergenauigkeiten mit den theoretisch berechneten Gewichten übereinstimmen.

Für die Berechnung der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe wurden die in Spalte 4 der Tabelle experimentell ermittelten mittleren Gewichte pro Flächenstanze herangezogen.

Tabelle (12):

Darstellung der theoretisch berechneten Gewichte der Flächenstanzen in Abhängigkeit zur Schnittdicke der gestanzten Hirnschnitte im Vergleich zu den experimentell ermittelten Stanzgewichten

| Spalte                                    | 1                        | 2                              | 3                                                                                   | 4                                                  |
|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Schnittdicke des gestanzten Hirnschnittes | Volumen der Einzelstanze | Feuchtgewicht der Einzelstanze | Trockengewicht der Einzelstanze theoretisch berechnetes Gewicht (25% Feuchtgewicht) | Experimentell ermitteltes Gewicht der Einzelstanze |
| (Mikrometer)                              | ( $10^{-3}\text{cm}^3$ ) | (mg)                           | (mg)                                                                                | (mg)                                               |
| 25                                        | 0,07                     | 0,07                           | 0,02                                                                                | 0,027                                              |
| 50                                        | 0,14                     | 0,14                           | 0,04                                                                                | 0,029                                              |
| 75                                        | 0,21                     | 0,21                           | 0,06                                                                                | 0,041                                              |
| 100                                       | 0,28                     | 0,28                           | 0,08                                                                                | 0,067                                              |

Die Bestimmung der Absolutaktivitäten pro Flächenstanze (DPM) erfolgte nach Lysierung der Stanze in Hyamin - wie beschrieben - im Flüssigkeitsszintillationszähler.

Die folgende Tabelle zeigt die im Flüssigkeitsszintillationszähler nach Quenchkorrektur gemessenen mittleren Zerfälle pro Minute (DPM) von Hirnstanzen aus Schnitten identischer Schnittdicke (75  $\mu\text{m}$ ) und unterschiedlicher Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose.

Tabelle (13):

Darstellung der DPM von Flächenstanzen aus Hirnschnitten identischer Schnittdicke und unterschiedlicher Menge an applizierter  $^{14}\text{C}$ -D-Glucose

| Ifd. Nummer<br>des Hirnes | Inkorporierte Gesamt-<br>aktivität<br>( $\mu\text{Ci}$ ) $^{14}\text{C}$ -D-Glucose | Schnittdicke<br>( $\mu\text{m}$ ) | mittlere CPM/Stanze $\pm$ S. D. |                   |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------|
|                           |                                                                                     |                                   | Rinde                           | Mark              |
| 7                         | 25                                                                                  | 75                                | 97.9 $\pm$ 10.75                | 71.725 $\pm$ 19.  |
| 4                         | 50                                                                                  | 75                                | 168.6 $\pm$ 23.75               | 138.65 $\pm$ 49.4 |
| 9                         | 50                                                                                  | 75                                | 164.8 $\pm$ 11.31               | 143.05 $\pm$ 16.3 |
| 5                         | 100                                                                                 | 75                                | 183.25 $\pm$ 37.83              | 199.45 $\pm$ 61.  |

Nach experimenteller Ermittlung der Hirngewichte auf einer Flächenstanze (a) und nach Messung der Absolutaktivitäten der Stanzen in Abhängigkeit von Schnittdicke und der dem Tier applizierten Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glucose (B) wird eine Relation (C) zwischen Hirngewicht und gewebsinkorporierter Aktivität rechnerisch aufgestellt.

Bei der Berechnung der spezifischen Aktivität im Hirngewebe - ausgedrückt in DPM/mg Hirngewebe - wurde von Mittelwerten der Hirngewichte wie von Mittelwerten der Zerfälle/Minute (DPM) in einer Stanze ausgegangen.

Tabelle (14):

Darstellung der Spezifischen Aktivität (DPM / mg Hirngewebe) in Flächenstanzen von Hirnschnitten identischer Schnittdicke und unterschiedlicher der Ratte applizierter Menge an  $^{14}\text{C}$ -D-Glucose

| Inkorporierte<br>Gesamtaktivität an<br>$^{14}\text{C}$ -D-Glucose<br>( $\mu\text{Ci}$ ) | Schnittdicke der<br>gestanzten Hirn-<br>schnitte<br>( $\mu\text{m}$ ) | SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (DPM / mg)<br>in der Hirnsubstanz einer Stanze |                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|                                                                                         |                                                                       | <u>RINDE</u><br>(DPM / mg)                                           | <u>MARK</u><br>(DPM / mg) |
| 25                                                                                      | 75                                                                    | 2478,481                                                             | 1815,823                  |
| 50                                                                                      | 75                                                                    | 4268,354                                                             | 3510,127                  |
| 75                                                                                      | 75                                                                    | 4172,152                                                             | 3621,520                  |
| 100                                                                                     | 75                                                                    | 4639,241                                                             | 5049,367                  |

### ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe wurde über Flächenstanzen, die aus den histologischen Hirnpräparaten gewonnen wurden, vorgenommen.

Diese Flächenstanzen wurden zunächst gewogen. Es konnte gezeigt werden, daß die Wägegenauigkeit des Verfahrens auch in Anbetracht der geringen Substanzgewichte der Flächenstanzen als ausreichend bezeichnet werden konnte.

Die Berechnung der Substanzgewichte auf einer Flächenstanze auf theoretischem Wege ergab eine ausreichende Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Substanzgewichten.

Nach Lysierung der Flächenstanzen in Hyamin wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler die pro Minute zu registrierenden Zerfälle einer Flächenstanze gemessen.

Die anschließende Korrelation der Zerfallsrate (DPM) mit dem Substanzgewicht der Flächenstanzen (mg) führte zu der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe, ausgedrückt als DPM/mg.

III.5) Mikro-absorptionsphotometrische Bestimmung der mittleren Extinktion (O.D.) im Autoradiogramm unterschiedlicher Spezifikationen.

Korrelation der mittleren Extinktion (O.D.) zu Schnittdicke, Expositionszeit und Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose, die den Tieren appliziert wurde.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die mikro-absorptionsphotometrische Extinktionsmessung in Autoradiogrammen, die durch Exposition von Standardpräparaten bekannter spezifischer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität hergestellt worden sind, Ergebnisse liefert, die in bestimmten Bereichen lineare Korrelationen zwischen (O.D.) und Expositionszeit und zwischen (O.D.) und spezifischer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität

belegen, war die physikalische Voraussetzung und Praktikabilität bewiesen, über die Mikro-Absorptionsphotometrie zu einer quantitativen Analyse der Flächen-dichtenverteilung (Silberbromidkristallverteilung) eines Autoradiogrammes zu gelangen.

Autoradiographien, die über die Exposition eines inhomogenen Gewebepreparates (Hirnschnitt) hergestellt werden, weisen naturgemäß auch eine inhomogene Schwärzung - d.h. Silberkorndichte oder -flächenverteilung - auf.

Es konnte nachgewiesen werden, daß differente morphologisch-anatomische Strukturen im Hirnschnitt (Rinde und Mark) auch durch eine differente mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) in dem Sinne gekennzeichnet sind, daß Rindenbereiche stärker geschwärzt zur Darstellung kommen als Markbereiche.

Im folgenden soll ermittelt werden, ob ähnliche oder gleiche lineare Korrelationen zwischen gemessener ( $\overline{O.D.}$ ), Schnittdicke und Expositionszeit in Autoradiogrammen inhomogen markierter Hirngewebsschnitte gefunden werden können, wie sie für solche von homogen markierten Standardpräparaten bereits bewiesen worden sind. Dabei interessiert im besonderen die Frage nach der Korrelation der im Hirnautoradiogramm gemessenen mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu der dem Versuchstier applizierten Gesamtmenge an  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ , weil davon ausgegangen werden darf, daß die applizierte Aktivität nicht streng mit der im Hirn wiedergefundenen korrelierbar ist.

Zur Klärung der gebotenen Fragestellung wurden in der oben beschriebenen Weise Hirnschnitte unterschiedlicher

Schnittdicke von Hirnen unterschiedlicher Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose unterschiedliche lange Zeiten gegenüber der photoempfindlichen Schicht exponiert.

Anschließend wurden die Autoradiogramme mikro-absorptionsphotometrisch vermessen.

Tabelle 15 zeigt das Autoradiogramm eines Hirnschnittes und die mittlere Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) für Rinde und Mark.

Tabelle (15):

Darstellung eines Hirnautoradiogrammes mit dem dazugehörigen Datenbild

| Hirn<br>Nummer | Mess-<br>Nummer | Gesamt-<br>aktivität<br>( $\mu\text{Ci}$ ) | Schnitt-<br>dicke<br>( $\mu\text{m}$ ) | Expozeit<br>(Tage) | RINDE                        |                          |                          | MARK                         |                          |                          |
|----------------|-----------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                |                 |                                            |                                        |                    | Anzahl<br>der Meß-<br>punkte | $\overline{\text{O.D.}}$ | $\overline{\text{S.D.}}$ | Anzahl<br>der Meß-<br>punkte | $\overline{\text{O.D.}}$ | $\overline{\text{S.D.}}$ |
| 71             | STA-1/106       | 75                                         | 75                                     | 3                  | 101                          | 57.04                    | 3.33                     | 100                          | 42.97                    | 7.31                     |



Die Standardabweichung des Mittelwertes (S.D.) wird als Maß für die Homogenität bzw. Inhomogenität der Silberkorndichtevertelung im Autoradiogramm berechnet.

In gleicher Weise wurden 57 weitere Hirngewebsschnitte aus unterschiedlichen Versuchstieren behandelt; die Zusammenstellung der mikro-absorptionsphotometrisch gemessenen mittleren Extinktionen für die Autoradiogramme unterschiedlicher Spezifikationen erfolgte in Tabelle 7.

Tabelle (7)

| Autoradiogramm<br>Nummer |      |      | Aktivität<br>µCi | Schnittdicke<br>µm | CORTEX<br>Expozeiten           |                                |                                | MARK<br>Expozeiten             |                                |                                |
|--------------------------|------|------|------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 24 h                     | 48 h | 72 h |                  |                    | 24 h<br>$\overline{QD} \pm SD$ | 48 h<br>$\overline{OD} \pm SD$ | 72 h<br>$\overline{OD} \pm SD$ | 24 h<br>$\overline{QD} \pm SD$ | 48 h<br>$\overline{OD} \pm SD$ | 72 h<br>$\overline{QD} \pm SD$ |
| 115                      | 119  | 123  | 100              | 100                | 21 3                           | 39 4                           | 72 8                           | 17 7                           | 29 8                           | 56 11                          |
|                          | 118  | 122  | 100              | 75                 |                                | 26 3                           | 56 4                           |                                | 15 2                           | 43 6                           |
|                          |      | 75   | 100              | 75                 |                                |                                | 20 2                           |                                |                                | 17 3                           |
| 113                      | 117  | 121  | 100              | 50                 | 13 2                           | 26 3                           | 45 5                           | 8 2                            | 17 5                           | 30 7                           |
|                          |      | 74   | 100              | 50                 |                                |                                | 22 5                           |                                |                                | 17 3                           |
|                          | 116  | 120  | 100              | 25                 |                                | 14 2                           | 27 3                           |                                | 8 2                            | 17 3                           |
| 103                      | 107  | 111  | 75               | 100                | 5 2                            | 44 5                           | 62 8                           | 4 1                            | 28 9                           | 49 11                          |
| 28                       | 52   | 72   | 75               | 100                | 14 3                           | 23 4                           | 60 6                           | 10 3                           | 16 3                           | 50 10                          |
| S32                      | S56  |      | 75               | 100                | 16 2                           | 24 3                           |                                | 11 3                           | 15 3                           |                                |
| 102                      | 106  | 110  | 75               | 75                 | 14 2                           | 41 2                           | 59 5                           | 9 3                            | 30 6                           | 37 7                           |
| 27                       | 51   | 71   | 75               | 75                 | 13 3                           | 23 2                           | 57 3                           | 8 1                            | 14 5                           | 43 7                           |
| S31                      | S55  |      | 75               | 75                 | 12 2                           | 23 4                           |                                | 10 3                           | 14 3                           |                                |
| 101                      | 105  | 109  | 75               | 50                 | 6 1                            | 28 4                           | 46 6                           | 4 1                            | 17 8                           | 29 8                           |
| 26                       |      | 70   | 75               | 50                 | 9 2                            |                                | 44 3                           | 7 2                            |                                | 31 8                           |
| S30                      | S54  |      | 75               | 50                 | 8 1                            | 14 3                           |                                | 5 1                            | 7 2                            |                                |
| 100                      | 104  | 108  | 75               | 25                 | 4 2                            | 22 1                           | 29 7                           |                                | 16 2                           | 16 5                           |
| 25                       |      | 69   | 75               | 25                 | 6 2                            |                                | 26 3                           | 5 1                            |                                | 17 4                           |
| 21                       | 45   | 68   | 50               | 100                | 8 1                            | 11 1                           | 33 5                           | 6 1                            | 6 5                            | 22 5                           |
| 20                       | 44   | 67   | 50               | 75                 | 8 1                            | 7 1                            | 34 3                           | 5 2                            | 5 1                            | 22 6                           |
| S24                      | S48  |      | 50               | 75                 | 5 1                            | 12 2                           |                                | 4 1                            | 6 2                            |                                |
| 19                       | 43   | 66   | 50               | 50                 | 6 1                            | 10 3                           | 22 4                           | 5 1                            | 8 2                            | 16 4                           |
|                          | S47  |      | 50               | 50                 |                                | 8 2                            |                                |                                | 5 1                            |                                |
|                          | S46  | 65   | 50               | 25                 |                                | 8 2                            | 17 2                           |                                | 5 2                            | 11 3                           |
|                          |      | 15   | 25               | 100                |                                |                                | 7 1                            |                                |                                | 6 1                            |
|                          |      | 14   | 25               | 75                 |                                |                                | 6 1                            |                                |                                | 5 1                            |
|                          |      | 13   | 25               | 50                 |                                |                                | 4 1                            |                                |                                | 4 1                            |

Die Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose, die den Tieren verabreicht wurde, wurde zwischen 25  $\mu\text{Ci}$  und 100  $\mu\text{Ci}$  variiert. Die Schnittdicke betrug 25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ . Die Schnitte wurden jeweils für 1, 2 und 3 Tage lang exponiert.

Es wird gezeigt, welchen Einfluß die applizierte Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose, die Expositionsdauer und die Schnittdicke auf die mittlere Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) im Autoradiogramm haben.

Die Messungen wurden getrennt für Rinde und Mark durchgeführt.

Die mit "S" bezeichneten Hirnnummern repräsentieren Extinktionsmessungen von Autoradiogrammen, die von Hirnschnitten nach erfolgter Flächenstanzung erstellt worden sind.

Alle in dieser Tabelle aufgeführten Extinktionswerte stammen aus Messungen der Autoradiogramme von Hirnschnitten nicht traumatisierter Rattenhirne.

Die "fehlenden" Meßwerte sind Autoradiogrammen zugeordnet, deren mikro-absorptionsphotometrisch bestimmte Extinktion keine ausreichende Untergrunddiskriminierung erkennen läßt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Abhängigkeit der mikro-absorptionsphotometrisch gemessenen mittleren Extinktionen ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) von der Schnittdicke ( $\mu\text{m}$ ) der autoradiographierten Hirnschnitte.

Es wurden jeweils Datenpaare (  $\overline{O.D.}$  ) :  $\mu\text{m}$  ) der Autoradiogramme von Hirnschnitten verschiedener Versuchstiere in einem Koordinatenkreuz gegeneinander aufgetragen.

Abbildung 26:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ : 100  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 1 Tag

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 1,00

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 1,00

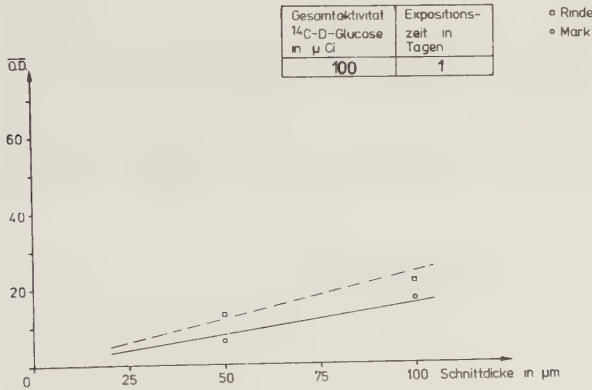


Abbildung 27:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ : 100  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 2 Tage

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,89

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,83

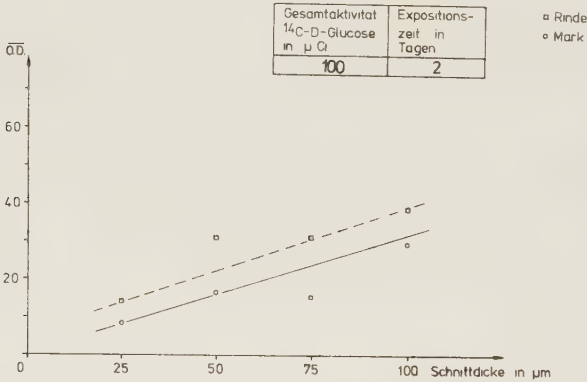


Abbildung 28:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ : 100  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 3 Tage

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,99

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 1,00

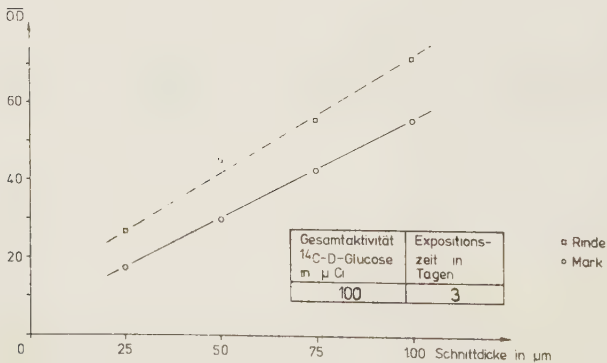


Abbildung 29:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 75  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 1 Tag

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,99

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,99

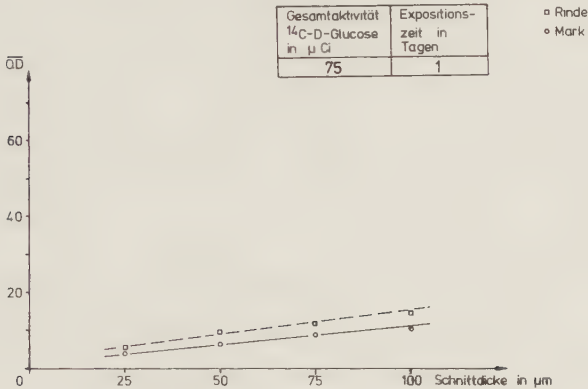


Abbildung 30:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 75  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 2 Tage

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,94

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,77

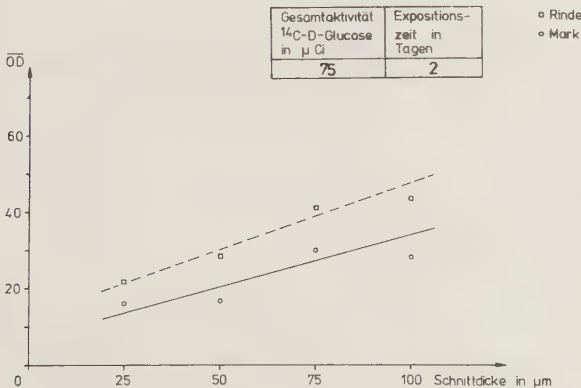


Abbildung 31:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ : 75  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 3 Tage

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,93

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,99

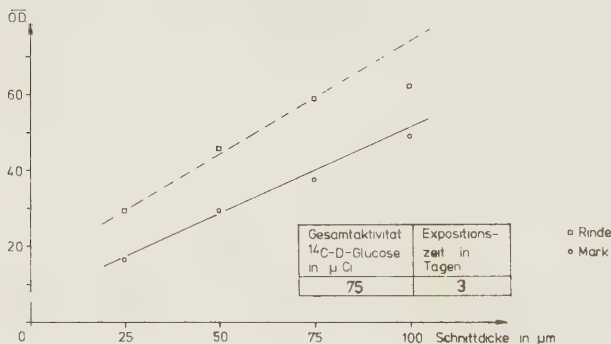


Abbildung 32:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ : 50  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 1 Tag

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,96

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,86

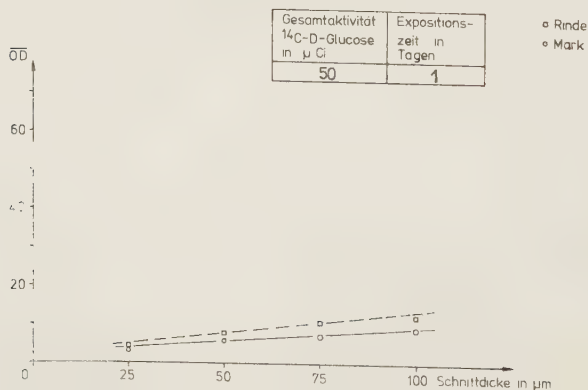


Abbildung 33:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 50  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 2 Tage

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,94

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,84

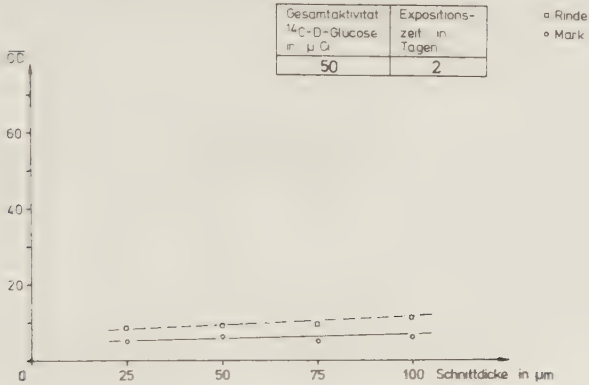


Abbildung 34:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 50  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 3 Tage

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,86

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,87

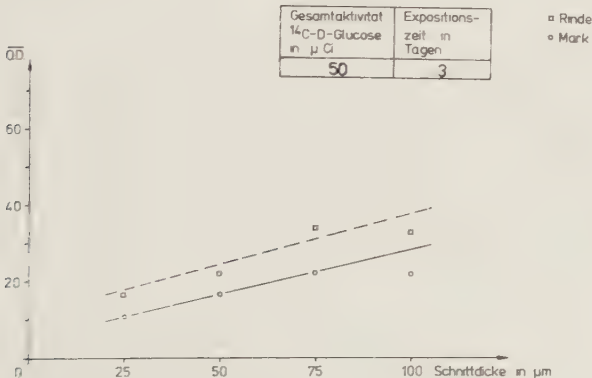
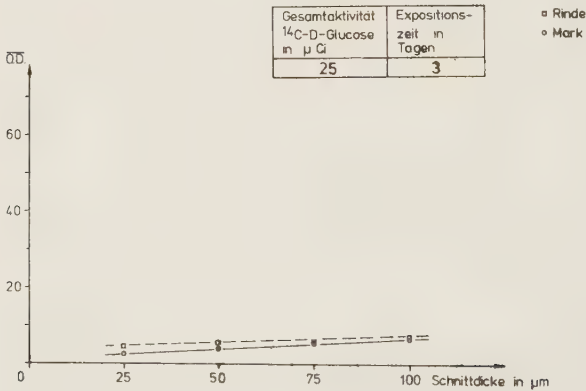


Abbildung 35:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte (25, 50, 75 und 100  $\mu\text{m}$ ).

Applizierte Gesamtaktivität:  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 25  $\mu\text{Ci}$   
Expositionszeit: 3 Tage

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,99  
Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,99



Die Abbildungen 26 - 35 belegen bei berechneten Korrelationskoeffizienten  $r^2 \geq 0,96$  für den Anpassungsgrad der gemessenen Extinktionswerte an die Funktion  $y = a + bx$  auch für das inhomogen markierte Hirngewebe eine lineare Abhängigkeit der meßbaren optischen Dichte im Autoradiogramm von der Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte.

Steigende Schichtdicken der autoradiographierten Hirnschnitte bedingen aufgrund der zunehmenden radioaktivitätstragenden Gewebssmasse auch eine Zunahme der meßbaren optischen Dichte im Autoradiogramm.

Dieses Verhalten ist für verschiedene dem Tier zugeführte Gesamtaktivitäten vergleichbar - allerdings letztlich abhängig von der tatsächlich im Gehirn abgelagerten  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose bzw.  $^{14}\text{C}$ -D-Glukosemetabolitkonzentration.

Diese wiederum ist von Tier zu Tier aus physiologischen Gründen verschieden.

Die Korrelation der mittleren Extinktion zur Expositionsdauer der Autoradiogramme bestätigt die aus den experimentellen Bedingungen her zu erwartende Zunahme der Schwärzung nach längerer Expositionszeit.

Die in Tabelle 7 ersichtliche und von den experimentellen Bedingungen her zu erwartende Zunahme der Schwärzung nach längeren Expositionszeiten ist in den folgenden Abbildungen gezeigt:

Abbildung 36:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme (1, 2 und 3 Tage).

Gesamtaktivität: 100  $\mu\text{Ci}$

Schnittdicke: 100  $\mu\text{m}$

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,97

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,96

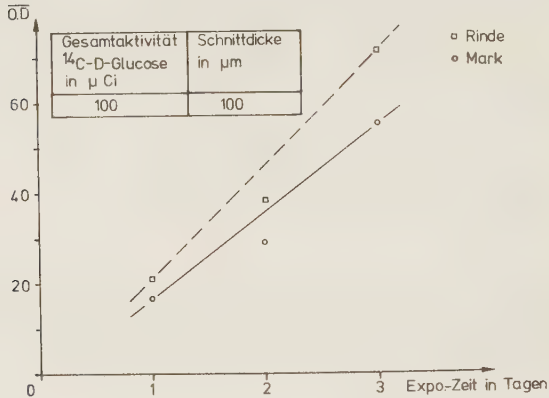


Abbildung 37:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme (1, 2 und 3 Tage).

Gesamtaktivität: 100  $\mu\text{Ci}$

Schnittdicke: 50  $\mu\text{m}$

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,99

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,98

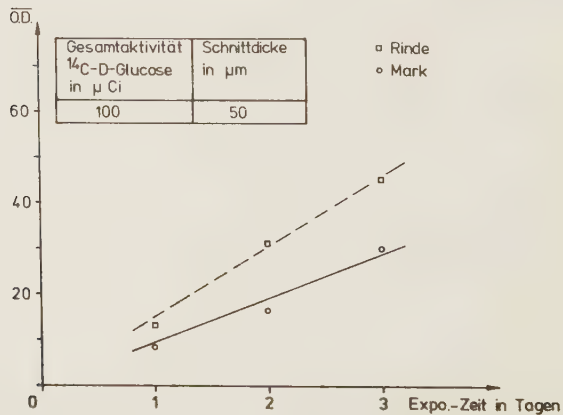


Abbildung 38:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme (1, 2 und 3 Tage).

Gesamtaktivität: 75  $\mu\text{Ci}$

Schnittdicke: 75  $\mu\text{m}$

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,98

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 1,00

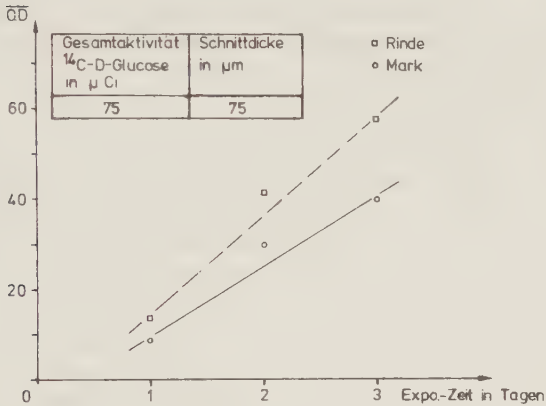


Abbildung 39:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme (1, 2 und 3 Tage).

Gesamtaktivität: 75  $\mu\text{Ci}$

Schnittdicke: 50  $\mu\text{m}$

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,99

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 1,00

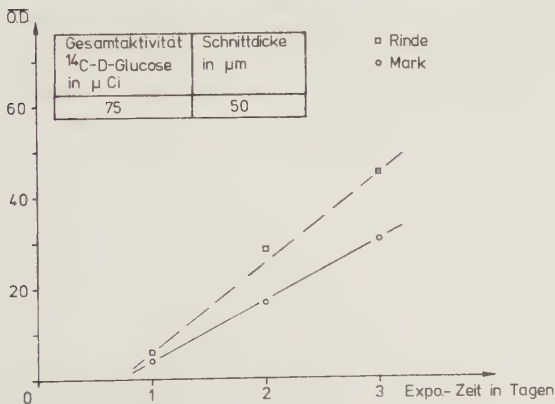


Abbildung 40:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme (1, 2 und 3 Tage).

Gesamtaktivität: 50  $\mu\text{Ci}$

Schnittdicke: 75  $\mu\text{m}$

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,83

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,77

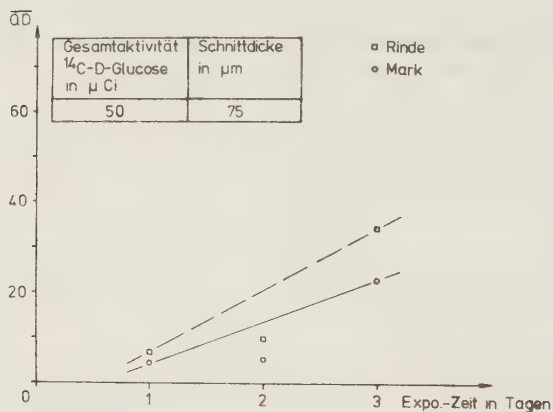


Abbildung 41:

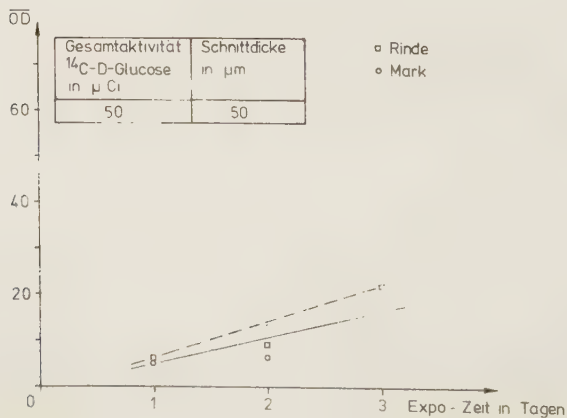
Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme 1, 2 und 3 Tage).

Gesamtaktivität: 50  $\mu\text{Ci}$

Schnittdicke: 50  $\mu\text{m}$

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Rinde: 0,89

Korrelationskoeffizient (lineare Regression)  $r^2$  Mark : 0,83



Bei Korrelationskoeffizienten von  $r^2 \geq 0,90$  (lineare Regression) für die Anpassung der gemessenen mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) an die Funktion  $y = a + bx$  kann eine lineare Korrelation für die Werte ( $\overline{O.D.}$ ) und Expositionszeit angenommen werden. Die in den oben gezeigten Abbildungen dargestellten Kurvenverläufe der Abhängigkeit ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit erfüllen diese Voraussetzungen.

Die in einem Autoradiogramm eines inhomogen mit  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose markierten Hirngewebsschnittes gemessene mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) darf somit als linear zu der verwendeten Expositionszeit des Schnittes korreliert betrachtet werden.

Die lineare Korrelation zwischen ( $\overline{O.D.}$ ) und Expositionszeit bis zu einer maximalen Zeit von 72 Stunden läßt im Gewebeschnitt jedoch eine kleinere spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität erwarten, als sie in den NEN-Standardpräparaten enthalten ist. (Sättigung der Photoemulsion bei hohen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten und langen Expositionszeiten; siehe Kapitel III.2).

Aus diesem Umstand ist zu ersehen, daß in Anbetracht einer besseren Untergrunddiskriminierung die Expositionszeiten auf 72 Stunden ausgedehnt werden können, ohne bei Sättigungserscheinungen der Photoemulsion Fehler erwarten zu müssen. Fernerhin ist es möglich, auf diese Weise (längere Expositionszeiten) auch kleinere Aktivitätsmengen zu erfassen.

Die Darstellung der Abhängigkeit zwischen mittlerer Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) und der Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose zeigen die folgenden Abbildungen:

Abbildung 42:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu der applizierten Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose (50, 75 und 100  $\mu\text{Ci}$ ).

Schnittdicke: 100  $\mu\text{m}$

Expositionszeit: 1 Tag

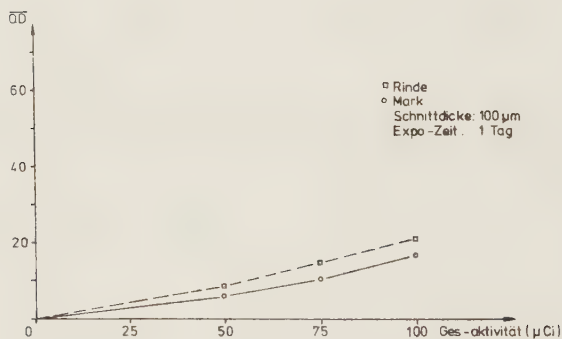


Abbildung 43:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu der applizierten Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose (50, 75 und 100  $\mu\text{Ci}$ ).

Schnittdicke: 100  $\mu\text{m}$

Expositionszeit: 2 Tage

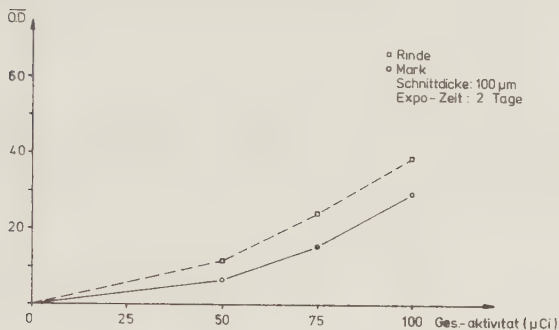
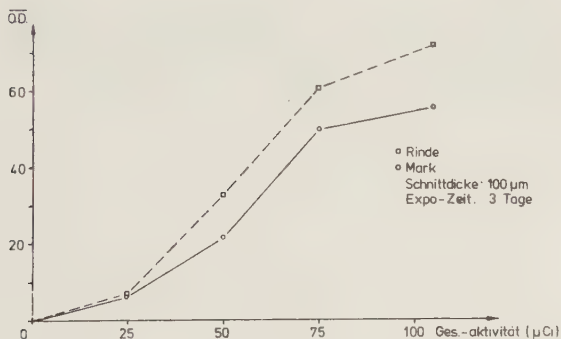


Abbildung 44:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu der applizierten Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose (50, 75 und 100  $\mu\text{Ci}$ ).

Schnittdicke: 100  $\mu\text{m}$

Expositionszeit: 3 Tage



Die in den Ablichtungen 42 - 44 dargestellten Korrelationen zwischen absorptionsphotometrisch gemessener mittlerer Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) und der dem Tier zugeführten Menge an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose unterscheiden sich in einem wesentlichen Punkt von den Abhängigkeiten zwischen optischer Dichte des Autoradiogrammes und Schnittdicke bzw. Expositionszeit inhomogen  $^{14}\text{C}$ -markierter Hirnschnitte: sie sind nicht linear !

Subsumierend läßt sich feststellen, daß die oben dargestellten Korrelationen ( $\overline{O.D.}$ ) / applizierte Gesamtaktivität offenbar von anderen als den erfaßten Faktoren (Schnittdicke, Expositionszeit) beeinflußt und alteriert werden, weil die Korrelationen ( $\overline{O.D.}$ ) / Schnittdicke und ( $\overline{O.D.}$ ) / Expositionszeit untereinander lineare Abhängigkeiten erbringen.

Dennoch kann gesagt werden, daß mit ansteigender Zufuhr an Radioaktivität ( $^{14}\text{C}$ -D-Glukose) in den Organismus der Ratte auch eine höhere, wenn auch nicht linear ansteigende Anreicherung an Aktivität ( $^{14}\text{C}$ -D-Glukose und  $^{14}\text{C}$ -D-Glukosemetabolite) im Gehirn zu erwarten ist.

Diese Aussage, die für den Vergleich von traumatisierten und Kontrolltieren von Bedeutung ist, soll an dieser Stelle festgehalten werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

In Hirnautoradiogrammen von Hirnschnitten unterschiedlicher Spezifikation wurde auf mikro-absorptionsphotometrischem Wege die mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) jeweils für Rinde und Mark gemessen.

Anschließend wurden Korrelationen zwischen  $\overline{O.D.}$  und Schnittdicke, Expositionszeit und Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C-D-Glukose}$  aufgestellt und zeichnerisch dargestellt.

Es darf festgehalten werden,

- 1.- daß die Korrelationen ( $\overline{O.D.}$ ) / Schnittdicke und Expositionszeit eine lineare Regression aufweisen.
- 2.- Im Gegensatz dazu ist die Korrelation ( $\overline{O.D.}$ ) / Gesamtmenge an dem Tier applizierter  $^{14}\text{C-D-Glukose}$  durch ein nicht lineares Verhalten charakterisiert.
- 3.- Im Gewebeschnitt scheinen geringere spezifische  $^{14}\text{C-Aktivitäten}$  im Vergleich zu den NEN-Standardpräparaten angereichert zu sein, weil bei den Hirnautoradiogrammen auch bei hohen Gesamtaktivitäten an  $^{14}\text{C-D-Glukose}$  und langen Expositionszeiten keine Sättigungserscheinung der Photoemulsion zu bemerken ist.

III.6) Bestimmung der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe und ihre Standardisierung.

Aus der experimentell bestätigten Linearität zwischen der Schwärzung im Autoradiogramm und der abgelagerten Radioaktivität für die angegebenen Expositionszeiten - sowohl bezogen auf die benutzten Standardpräparate als auch für die Hirnschnitte verschiedener Dicke - ergibt sich, daß über eine Eichkurve eine Berechnung der pro Flächeneinheit abgelagerten  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose- bzw.  $^{14}\text{C}$ -D-Glukosemetabolit-Aktivität möglich ist.

Damit kann die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität bestimmt und direkt über das Autoradiogramm eine Aussage über die molekulare  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose-Anreicherung und die lokale Verteilung gemacht werden, was bei bekannter molekular-kinetischer Verteilung auch Aussagen über die lokalen  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose-Umsatzraten zuläßt.

Dies ist für die Beurteilung therapeutischer Effekte im Ödembereich bisher nicht bekannt.

Es ist im Rahmen dieses Experimentalansatzes zum Zeitpunkt der Tötung des Tieres unbekannt, wieviel radioaktive Glukose sich letztlich im Hirn befindet und mit Hilfe der Autoradiographie über die Flächendichteverteilung der Silberbromidkristalle in der Photoemulsion zur Darstellung kommt.

Dieser Wert läßt sich nicht prozentual aus der bekannten Gesamtmenge an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose extrapolieren, sondern muß getrennt von solchen Schlußfolgerungen im später zu autoradiographierenden Hirngewebe experimentell er-

mittelt werden. Aus diesem Grunde wurden Gewebsproben in Form von Flächenstanzen aus unterschiedlich dicken Hirnschnitten entnommen, gewogen und im Flüssigkeitszintillationszähler auf ihren  $^{14}\text{C}$ -Gehalt hin (DPM) analysiert.

Bei jeder einzelnen Messung wurde eine Quenchkorrektur vorgenommen.

Mit Kenntnis dieser beiden Parameter (Gewicht der auf einer Stanze befindlichen Hirnsubstanz und Radioaktivität derselben als DPM) läßt sich die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität des autoradiographierten Hirngewebes berechnen und zu der im Autoradiogramm gemessenen mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) korrelieren.

Die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität wird über die Funktion DPM/mmol einmal als Konzentrationsangabe für den Anteil an radioaktiv markierten Molekülen, zum anderen in Anlehnung an die Problemstellung dieser Arbeit als DPM/mg Hirngewebe formuliert und gibt die im Gewichtsanteil enthaltene Anzahl radioaktiv markierter Moleküle wieder.

Mit dem Ziel einer Korrelation der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe zu der Schwärzung in den entsprechenden Hirnautoradiogrammen ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) wurden zunächst die spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten in Hirnschnitten unterschiedlicher Schnittdicke von Versuchstieren, die unterschiedlich hohe Gesamtmengen an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose erhalten hatten, über Flächenstanzen experimentell ermittelt und berechnet.

Sodann wurden die Hirngewebsschnitte für jeweils einen und drei Tage lang gegenüber der Photoemulsion exponiert und die mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im fertigen Autoradiogramm mikro-absorptionsphotometrisch bestimmt.

Diese Maßnahme wurde an insgesamt 42 Hirngewebsschnitten unterschiedlicher Spezifikation vorgenommen.

Tabelle 16:

Darstellung der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -  
Aktivität in 42 Hirngewebsschnitten  
unterschiedlicher Spezifikation.

Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 50,75,100  $\mu\text{Ci}$   
Schnittdicke : 50,75,100  $\mu\text{m}$ .

Zuordnung der mikro-absorptionsphotometrisch ge-  
messenen mittleren Extinktion (O.D.) nach 1 und  
3 Tagen Expositionszeit zu der gewebsinkorporierten  
spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der autoradiographierten  
Rattenhirnschnitte.

| Gesamtaktivität<br>$^{14}\text{C}$ -D-Glu. |                 | 100                                    |        |        | 75                                     |        |        | 50                                     |        |        |
|--------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------|--------|--------|----------------------------------------|--------|--------|----------------------------------------|--------|--------|
| Schnittdicke<br>( $\mu\text{m}$ )          | Probe<br>Nummer | Spez. Aktivität<br>im Hirn<br>(DPM/mg) | O. D.  |        | Spez. Aktivität<br>im Hirn<br>(DPM/mg) | O. D.  |        | Spez. Aktivität<br>im Hirn<br>(DPM/mg) | O. D.  |        |
|                                            |                 |                                        | 1. Tag | 3. Tag |                                        | 1. Tag | 3. Tag |                                        | 1. Tag | 3. Tag |
| 100                                        | 5               |                                        |        |        |                                        |        |        | 2716                                   | 12,4   | 54,9   |
|                                            | 29              |                                        |        |        | 3407                                   | 15,4   | 74,2   | 3489                                   |        | 34,0   |
|                                            | 37              |                                        |        |        | 3406                                   | 15,4   | 74,2   |                                        |        |        |
|                                            | 13              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 21              | 5477                                   | 24,8   | 99,0   |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 9               |                                        |        |        |                                        |        |        | 2899                                   | 9,2    | 45,0   |
|                                            | 39              |                                        |        |        |                                        |        |        | 1941                                   |        | 31,4   |
|                                            | 41              |                                        |        |        | 2829                                   | 11,1   | 98,1   |                                        |        |        |
|                                            | 17              |                                        |        |        | 3658                                   | 11,1   | 93,1   |                                        |        |        |
|                                            | 39              | 5822                                   | 25,2   | 92,8   |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 45              |                                        |        |        |                                        |        |        | 1134                                   | 4,4    |        |
|                                            | 53              |                                        |        |        | 4149                                   | 14,0   |        |                                        |        |        |
| 75                                         | 49              |                                        |        |        | 4656                                   | 10,9   |        | 2537                                   | 5,9    |        |
|                                            | 57              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 6               |                                        |        |        |                                        |        |        | 3732                                   | 10,7   | 52,3   |
|                                            | 30              |                                        |        |        | 2996                                   | 12,0   | 61,2   | 2679                                   | 7,3    | 28,9   |
|                                            | 36              |                                        |        |        | 4121                                   | 12,0   | 61,2   |                                        |        |        |
|                                            | 22              | 7829                                   | 18,6   | 88,0   |                                        |        |        | 3290                                   | 7,1    | 36,1   |
|                                            | 10              |                                        |        |        |                                        |        |        | 2870                                   | 5,3    | 25,5   |
|                                            | 34              |                                        |        |        | 4985                                   | 8,4    | 49,2   |                                        |        |        |
|                                            | 42              |                                        |        |        | 3985                                   | 8,4    | 49,2   |                                        |        |        |
|                                            | 18              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 26              | 6481                                   | 13,4   | 67,7   |                                        |        |        | 3512                                   | 5,5    |        |
|                                            | 46              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
| 50                                         | 54              |                                        |        |        | 5428                                   | 11,7   |        | 1804                                   | 4,4    |        |
|                                            | 50              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 58              |                                        |        |        | 5487                                   | 9,7    |        |                                        |        |        |
|                                            | 7               |                                        |        |        |                                        |        |        | 3004                                   | 8,1    | 41,1   |
|                                            | 31              |                                        |        |        | 6381                                   | 10,2   | 98,2   | 2894                                   | 5,2    | 19,1   |
|                                            | 39              |                                        |        |        | 4286                                   | 10,2   | 98,2   |                                        |        |        |
|                                            | 15              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 13              | 6511                                   | 14,0   | 69,3   |                                        |        |        | 2704                                   | 6,3    | 29,1   |
|                                            | 11              |                                        |        |        |                                        |        |        | 1478                                   | 6,3    | 20,6   |
|                                            | 35              |                                        |        |        | 3678                                   | 6,5    | 33,5   |                                        |        |        |
|                                            | 43              |                                        |        |        | 3827                                   | 6,5    | 33,5   |                                        |        |        |
|                                            | 19              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
| 50                                         | 27              | 5862                                   | 11,8   | 60,5   |                                        |        |        | 1966                                   |        |        |
|                                            | 47              |                                        |        |        |                                        |        |        |                                        |        |        |
|                                            | 55              |                                        |        |        | 5952                                   | 7,6    |        |                                        |        |        |
|                                            | 51              |                                        |        |        |                                        |        |        | 4024                                   |        |        |
|                                            | 59              |                                        |        |        | 5120                                   | 4,7    |        |                                        |        |        |

Die Darstellung der Abhängigkeit der mikro-absorptions-photometrisch gemessenen mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) von der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe für verschiedene Expositionszeiten führt zu folgenden Kurvenbildern:

Abbildung 45:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Autoradiogramm zu der gewebesinkorporierten spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe.

Expositionszeit: 1 Tag

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Autoradiogramm zu der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der NEN-Standards.

Expositionszeit: 1 Tag

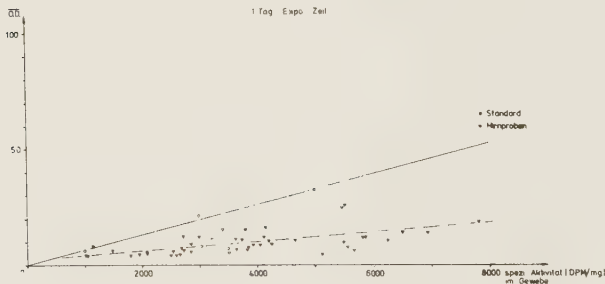


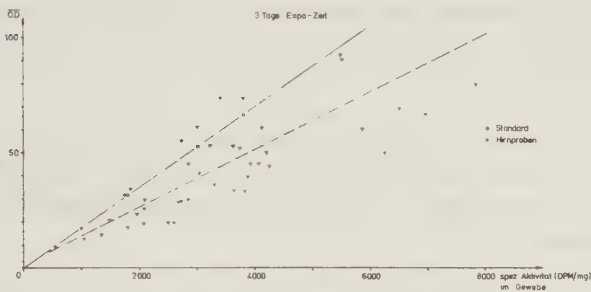
Abbildung 46:

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Autoradiogramm zu der gewebsinkorporierten spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe.

Expositionszeit: 3 Tage

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Autoradiogramm zu der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der NEN-Standards.

Expositionszeit: 3 Tage



Die Korrelationskoeffizienten der in Abbildung 45 und 46 dargestellten Abhängigkeiten zwischen ( $\overline{O.D.}$ ) und spezifischer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in Hirngewebe und Standard betragen:

Korrelationskoeff. (lineare Regr.)  $r^2$  Hirngewebe (1 Tag Exp.): 0,37  
Korrelationskoeff. (lineare Regr.)  $r^2$  Standard (1 Tag Exp.): 0,92  
Korrelationskoeff. (lineare Regr.)  $r^2$  Hirngewebe (3 Tage Exp.): 0,61  
Korrelationskoeff. (lineare Regr.)  $r^2$  Standard (3 Tage Exp.): 0,99

Aus dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß für nicht zu hohe spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten im Hirngewebe die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität auch hier linear zu der im Autoradiogramm gemessenen mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) korreliert ist.

Die Funktion beginnt ab einer spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität von etwa 5000 DPM/mg Hirngewebe von der linearen Beziehung abzuweichen, was sich auch in den relativ schlechten Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,37$  für einen Tag Expositionszeit bzw.  $r^2 = 0,61$  für 3 Tage Expositionszeit dokumentiert.

Für diesen unerwünschten Effekt sind Sättigungerscheinungen der Photoemulsion bei hohen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten und langen Expositionszeiten verantwortlich zu machen.

Zum Vergleich ist die Abhängigkeit der gemessenen mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) von der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der NEN-Standards in die oben gezeigten Schaubilder eingetragen.

Es fällt auf, daß die Steigung dieser Funktion höher ist als die der Korrelation der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe zu der im Autoradiogramm gemessenen mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ).

Für diesen Effekt ist ursächlich eine höhere  $\beta$ -Selbstabsorptionsrate der aktivitätstragenden Hirngewebschnitte im Vergleich zu den radioaktiven synthetischen Methylmetacrylatstandards zu nennen, die bewirkt, daß bei gleichen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten und gleichen Expositionszeiten beider Strahlenquellen die Filmschwärzung unter dem Hirngewebe geringer ausfällt als die unter dem Standard.

Ein Vergleich der von beiden Strahlenquellen hervorgerufenen Schwärzungsintensitäten im Autoradiogramm und ein direkter Rückschluß von der dem Standard zugeordneten

mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) auf die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe erscheint aus diesem Grunde problematisch.

Eine Berechnung der mittleren optischen Dichte ( $\overline{O.D.}$ ) pro Meßfeld, die durch eine spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe von 1000 Zerfällen pro Stunde und Milligramm (1000 DPM/mg) in der photoempfindlichen Schicht hervorgerufen wird, ist in der folgenden Tabelle für Expositionszeiten von 24, 48 und 72 Stunden angegeben.

Tabelle (17):

Berechnung der pro 1000 Zerfälle pro Stunde erzeugten Schwärzung ( $\overline{O.D.}$ )

|                            | Zeit (Stunden)  |                 |                 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                            | 24              | 48              | 72              |
| $\overline{O.D.} \pm S.D.$ | 0,12 $\pm$ 0,05 | 0,08 $\pm$ 0,05 | 0,20 $\pm$ 0,07 |

Innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes (S.D.) ist kein signifikanter Unterschied in der Schwärzung (resultierend aus 1000 DPM/mg) zu messen.

Damit ist es gelungen, die Methode insofern zu standardisieren, als die in einem Hirnautoradiogramm gemessene mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) direkt in die gewebsinkorporierte spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität umgerechnet werden kann.

Für die absolute Bestimmung der abgelagerten Radioaktivität im Hirngewebe muß daher folgende experimentelle Standardbehandlung erfolgen:

- 1.- Verabreichung der radioaktiv markierten  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose in Beträgen von 25 - 50  $\mu\text{Ci}$  pro Tier.
- 2.- Anfertigen von Hirngewebsschnitten mit Schnittdicken zwischen 25 und 50  $\mu\text{m}$ .
- 3.- Anfertigen von Autoradiogrammen durch Exposition der gefriergetrockneten Hirnschnitte gegenüber einer photoempfindlichen Schicht. Die Expositionszeiten betragen dabei 2 - 3 Tage.
- 4.- Bestimmung der mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) pro Meßfeld der Autoradiogramme mit Hilfe der Scanning-Mikro-Absorptionsphotometrie. Das Meßfeld ist hierbei variabel zwischen 100 und 400 Mikrometern.
- 5.- Berechnung der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität (DPM/mg) pro Meßfeld.
- 6.- Darstellung der Mikroverteilung und gegebenenfalls topographische Analyse.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität wurde in 42 Hirngewebsschnitten unterschiedlicher Schnittdicke und unterschiedlicher Gesamtmenge an applizierter  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose über Flächenstanzungen bestimmt.

Anschließend wurden die Hirnschnitte für einen bzw. drei Tage lang gegenüber der photoempfindlichen Schicht exponiert.

Die fertigen Autoradiogramme wurden mikro-absorptions-photometrisch vermessen und die mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) auf diese Weise experimentell bestimmt.

Es konnte gezeigt werden:

- 1.- daß bis zu einer spezifischen gewebsinkorporierten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität von ca. 5000 DPM/mg Hirngewebe auch für das inhomogen  $^{14}\text{C}$ -markierte Hirngewebe eine lineare Korrelation zwischen der im Autoradiogramm gemessenen Extinktion und der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Gewebe besteht.
- 2.- Bei höheren spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten und langen Expositionszeiten kommen Sättigungserscheinungen der photoempfindlichen Emulsion zur Auswirkung, was sich in einem Abweichen der Funktion von der linearen Korrelation dokumentiert.
- 3.- Hirngewebe hat im Vergleich zu  $^{14}\text{C}$ -markierten Methylmetacrylat-Standards eine höhere  $\beta$ -Selbstabsorptionsrate, so daß ein direkter Schluß von der gemessenen Extinktion im Standard auf die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe fragwürdig erscheint. Die spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität muß im Hirngewebe selbst bestimmt werden.
- 4.- Es konnte berechnet werden, wie hoch die mittlere Extinktion eines Autoradiogrammes ist, die von einer spezifischen gewebsgebundenen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität von 1000 DPM/mg in der Photoemulsion induziert und dann

im fertigen Autoradiogramm gemessen wird. Die Berechnung wurde für Expositionszeiten von 1 - 3 Tagen aufgestellt.

Damit war die Standardisierung des Meßverfahrens insofern gelungen, als nunmehr in einem beliebigen Hirnautoradiogramm nur noch die Extinktion gemessen werden muß; die spezifische gewebssinkorporierte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität kann dann leicht rechnerisch durch Multiplikation mit dem oben genannten Faktor ermittelt werden.

### III.7) Vergleich der mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) in Autoradiogrammen von Hirnschnitten traumatisierter und nicht traumatisierter Tiere.

In Analogie zu den Kontrolltieren wurden die Autoradiogramme von Hirnschnitten traumatisierter Tiere mikroabsorptionsphotometrisch vermessen.

Ein Teil der Ergebnisse (mittlere Extinktionen ( $\overline{\text{O.D.}}$ )-Werte sowie deren Korrelation zu Schnittstärke und Expositionszeit) ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 18: Darstellung der mikro-absorptionsphotometrisch bestimmten mittleren Extinktionen von Autoradiogrammen von Hirnschnitten traumatisierter Tiere.

Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu Schnittdicke und Expositionszeit und Gesamtaktivität an applizierter  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose.

| Autoradiogrammnummer |      |      | Aktivität<br>$\mu\text{Ci}$ | Schnittdicke<br>$\mu\text{m}$ | CORTEX<br>Expozeiten |             |             | MARK<br>Expozeiten |             |             |
|----------------------|------|------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| 1 h                  | 48 h | 72 h |                             |                               | 24 h                 | 48 h        | 72 h        | 24 h               | 48 h        | 72 h        |
|                      |      |      |                             |                               | OD $\pm$ SD          | OD $\pm$ SD | OD $\pm$ SD | OD $\pm$ SD        | OD $\pm$ SD | OD $\pm$ SD |
| 5                    |      | 146  | 100                         | 100                           | 25 7                 |             | 95 19       | 25 7               |             | 93 17       |
| 28                   |      | 149  | 100                         | 75                            | 17 5                 |             | 80 18       | 13 4               |             | 68 5        |
| 27                   |      | 148  | 100                         | 50                            | 14 3                 |             | 69 15       | 12 7               |             | 61 5        |
| 16                   |      | 147  | 100                         | 25                            | 9 7                  |             | 44 11       | 7 2                |             | 40 9        |
| 2                    |      | 153  | 75                          | 100                           | 15 7                 |             | 74 10       | 11 9               |             | 53 15       |
| 6                    |      | 157  | 75                          | 100                           | 14 3                 |             | 65 49       | 10 3               |             | 58 9        |
| 1                    |      | 152  | 75                          | 75                            | 12 8                 |             | 61 7        | 9 4                |             | 45 14       |
| 5                    |      | 156  | 75                          | 75                            | 11 3                 |             | 54 52       | 9 3                |             | 51 40       |
| 0                    |      | 151  | 75                          | 50                            | 10 2                 |             | 50 7        | 6 2                |             | 33 12       |
| 4                    |      | 155  | 75                          | 50                            | 9 7                  |             | 41 14       | 7 2                |             | 36 9        |
| 9                    |      | 154  | 75                          | 25                            | 6 5                  |             | 27 8        | 4 1                |             | 52 6        |
| 3                    |      | 150  | 75                          | 25                            | 5 1                  |             | 29 3        | 4 1                |             | 19 8        |
| 4                    |      | 161  | 50                          | 100                           | 12 3                 |             | 34 17       | 9 2                |             | 31 10       |
|                      |      | 165  | 50                          | 100                           |                      |             | 55 15       |                    |             | 45 10       |
| 9                    |      | 160  | 50                          | 75                            | 7 3                  |             | 29 14       | 5 1                |             | 26 6        |
| 3                    |      | 164  | 50                          | 75                            | 11 3                 |             | 52 11       | 7 2                |             | 36 11       |
| 8                    |      | 159  | 50                          | 50                            | 5 1                  |             | 19 10       | 5 1                |             | 21 5        |
| 2                    |      | 163  | 50                          | 50                            | 8 2                  |             | 41 7        | 6 5                |             | 29 10       |
| 1                    |      | 158  | 50                          | 25                            | 4 1                  |             | 14 6        | 4 1                |             | 13 3        |

Es lassen sich für die experimentell gegebenen Parameter die gleichen Korrelationen wie bei den Kontrollen berechnen.

Die linearen Beziehungen erlauben auch hier, bei bekannter mittlerer Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) auf den Grad der Schwärzung zurückzuschließen und diesen in die gewebsinkorporierten spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten umzurechnen.

Abbildung 47:

Darstellung der Korrelation der mittleren Extinktion traumatisierter Hirnautoradiogramme zu der Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte.

Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 50  $\mu\text{Ci}$

Expositionszeit: 1 Tag

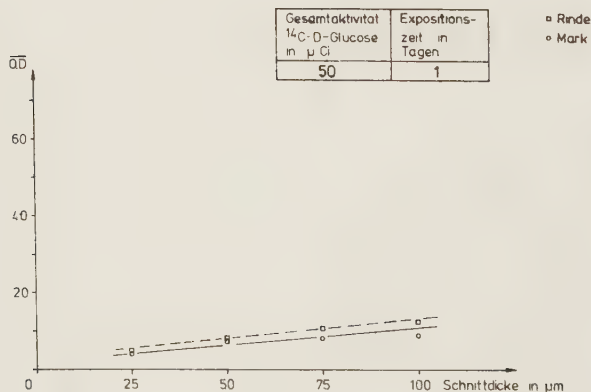


Abbildung 48:

Graphische Darstellung der Korrelation der mittleren Extinktion (O.D.) traumatisierter Hirnautoradiogramme zu der Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte.

Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 100  $\mu\text{Ci}$   
Expositionszeit: 3 Tage

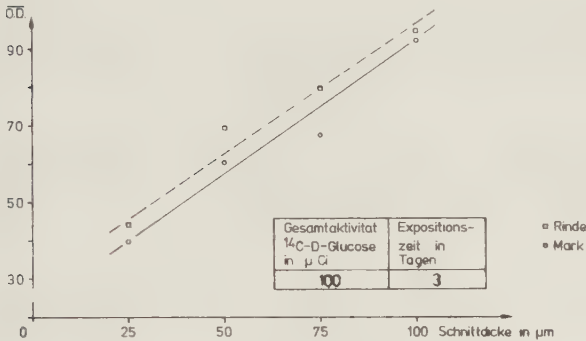


Abbildung 49:

Graphische Darstellung der Korrelation der mittleren Extinktion (O.D.) traumatisierter Hirnautoradiogramme zu der Expositionszeit der autoradiographierten Hirnschnitte.

Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 75  $\mu\text{Ci}$   
Schnittdicke: 50  $\mu\text{m}$

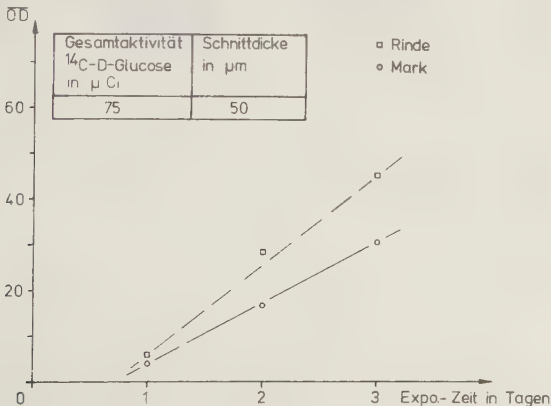


Abbildung 5o: Autoradiogramme von Hirnschnitten  
verschiedener traumatisierter  
Hirnschnitte.

|                       |                                              |                   |
|-----------------------|----------------------------------------------|-------------------|
| Hirnschnitt Nr. 154 : | Gesamtaktivität $^{14}\text{C}$ -D-Glukose : | 75 $\mu\text{Ci}$ |
|                       | Schnittdicke :                               | 25 $\mu\text{m}$  |
|                       | Expositionszeit :                            | 3 Tage            |
| Hirnschnitt Nr. 155 : | Gesamtaktivität $^{14}\text{C}$ -D-Glukose : | 75 $\mu\text{Ci}$ |
|                       | Schnittdicke :                               | 50 $\mu\text{m}$  |
|                       | Expositionszeit :                            | 3 Tage            |
| Hirnschnitt Nr. 156 : | Gesamtaktivität $^{14}\text{C}$ -D-Glukose : | 75 $\mu\text{Ci}$ |
|                       | Schnittdicke :                               | 75 $\mu\text{m}$  |
|                       | Expositionszeit :                            | 3 Tage            |
| Hirnschnitt Nr. 157 : | Gesamtaktivität $^{14}\text{C}$ -D-Glukose : | 75 $\mu\text{Ci}$ |
|                       | Schnittdicke :                               | 100 $\mu\text{m}$ |
|                       | Expositionszeit :                            | 3 Tage            |

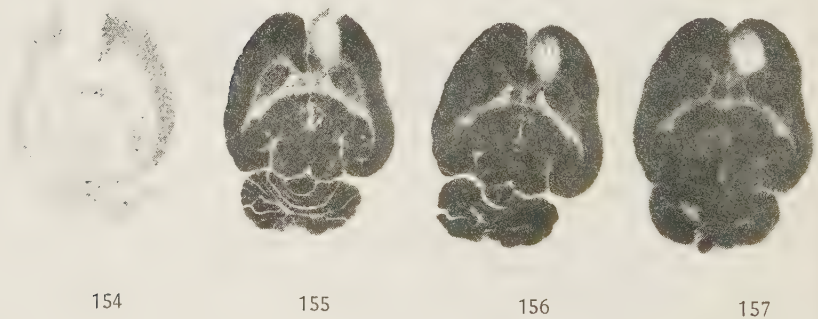


Abbildung 5o zeigt die Autoradiogramme verschiedener Hirngewebs-  
schnitte.

Der Bereich des Traumas (Hirnödem) kann sowohl im Autoradiogramm als "Aufhellung" als auch im Datenbild deutlich als Bereich mit geringerer mittlerer Extinktion ( $\bar{O.D.}$ ) abgegrenzt werden.

Die Traumatisierung hat eine verminderte (perifokale Zone) bzw. eine ausgefallene (zentrale Nekrose, irreversibel) Stoffwechselleistung der Neurone zur Folge, was sich in einer verringerten bzw. dem Untergrund im Autoradiogramm angenäherten Silberkorndichteverteilung in der entwickelten Photoemulsion dokumentiert. Die Silberkorndichteverteilung ist eine Funktion der spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe und überall dort verringert, wo das Trauma selbst oder seine Auswirkungen (perifokaler Bereich) zu einem verminderten lokalen Glukoseumsatz geführt haben. Welche Auswirkungen eine derartige Traumatisierung auf den gesamten zerebralen Glukosemetabolismus hat, bleibt einer anschließenden vergleichenden Betrachtung korrespondierender Hirnloci im traumatisierten und nicht traumatisierten Hirn vorbehalten.

Tabelle 19 zeigt eine Gegenüberstellung mikro-absorptionsphotometrisch ermittelter Extinktionswerte korrespondierender Bereiche aus Autoradiogrammen von Schnitten aus traumatisierten und nicht traumatisierten Rattenhirnen.

Tabelle 19: Vergleich mikro-absorptionsphotometrisch bestimmter mittlerer optischer Dichtewerte ( $\overline{O.D.}$ ) von Autoradiogrammen traumatisierter und nicht traumatisierter Hirngewebsschnitte.

| $\overline{X}$ EXTINKTION |                |                                      |                              |                    | -                       |       | mittlere O. D. = $\overline{O. D.}$ |       | mittlere O. D. = $\overline{O. D.}$ |                              | -                                    |                | $\overline{X}$ EXTINKTION |  |  |  |  |
|---------------------------|----------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------------|-------------------------|-------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|----------------|---------------------------|--|--|--|--|
|                           |                |                                      |                              |                    | TRAUMATISIERTE<br>HIRNE |       | NICHT TRAUMATISIERTE<br>HIRNE       |       |                                     |                              |                                      |                |                           |  |  |  |  |
| Hirn<br>Nummer            | Mess<br>Nummer | Gesamt-<br>aktivität<br>( $\mu Ci$ ) | Schnitt-<br>dicke<br>$\mu m$ | Expozeit<br>(Tage) | RINDE                   | MARK  | RINDE                               | MARK  | Expozeit<br>(Tage)                  | Schnitt-<br>dicke<br>$\mu m$ | Gesamt-<br>aktivität<br>( $\mu Ci$ ) | Mess<br>Nummer | Hirn<br>Nummer            |  |  |  |  |
| 165                       | STA-1/177      | 50                                   | 100                          | 3                  | 54,90                   | 44,95 | 32,92                               | 21,83 | 3                                   | 100                          | 50                                   | STA-1/103      | 68                        |  |  |  |  |
| 164                       | STA-1/176      | 50                                   | 75                           | 3                  | 52,25                   | 36,14 | 34,11                               | 22,28 | 3                                   | 75                           | 50                                   | STA-1/102      | 67                        |  |  |  |  |
| 163                       | STA-1/175      | 50                                   | 50                           | 3                  | 41,12                   | 29,10 | 21,90                               | 16,49 | 3                                   | 50                           | 50                                   | STA-1/101      | 66                        |  |  |  |  |
| 162                       | STA-1/174      | 50                                   | 25                           | 3                  | 23,29                   | 17,44 | 16,54                               | 10,77 | 3                                   | 25                           | 50                                   | STA-1/100      | 65                        |  |  |  |  |
| 153                       | STA-1/165      | 75                                   | 100                          | 3                  | 74,22                   | 53,08 | 61,84                               | 48,57 | 3                                   | 100                          | 75                                   | STA-1/126      | 111                       |  |  |  |  |
| 152                       | STA-1/164      | 75                                   | 75                           | 3                  | 61,17                   | 45,24 | 58,52                               | 37,22 | 3                                   | 75                           | 75                                   | STA-1/125      | 110                       |  |  |  |  |
| 151                       | STA-1/163      | 75                                   | 50                           | 3                  | 50,18                   | 33,45 | 45,57                               | 29,39 | 3                                   | 50                           | 75                                   | STA-1/124      | 109                       |  |  |  |  |
| 150                       | STA-1/162      | 75                                   | 25                           | 3                  | 29,37                   | 19,49 | 29,17                               | 16,25 | 3                                   | 25                           | 75                                   | STA-1/123      | 108                       |  |  |  |  |
| 146                       | STA-1/158      | 100                                  | 100                          | 3                  | 95,05                   | 92,78 | 71,68                               | 55,76 | 3                                   | 100                          | 100                                  | STA-1/138      | 123                       |  |  |  |  |
| 149                       | STA-1/161      | 100                                  | 75                           | 3                  | 80,14                   | 67,65 | 56,00                               | 42,08 | 3                                   | 75                           | 100                                  | STA-1/137      | 122                       |  |  |  |  |
| 148                       | STA-1/160      | 100                                  | 50                           | 3                  | 69,32                   | 60,51 | 44,96                               | 29,93 | 3                                   | 50                           | 100                                  | STA-1/136      | 121                       |  |  |  |  |
| 147                       | STA-1/159      | 100                                  | 25                           | 3                  | 44,00                   | 39,60 | 26,48                               | 17,25 | 3                                   | 25                           | 100                                  | STA-1/135      | 120                       |  |  |  |  |

Für jedes direkt korrelierte Wertepaar (mittlere Extinktion,  $\overline{O.D.}$ -Werte) aus Autoradiogrammen traumatisierter und nicht traumatisierter Hirnschnitte wurden die Faktoren Gesamtaktivität an  $^{14}C$ -D-Glukose, Schnitt- dicke der autoradiographierten Hirnschnitte und Expo- sitionszeit der Schnitte gegenüber der Photoemulsion konstant gehalten, um einen direkten Vergleich zu er- möglichen.



**Placeholder**

Für die Betrachtung müssen die interessierenden Bereiche aus einem Gewebszylinder herausgestanzt und in bestimmten Medien inkubiert werden. Es liegt auf der Hand, daß ein vorgeschädigtes Hirn (z.B. Hirnödem) - mit veränderten Stoffwechselfparametern aus dem Gewebszusammenhang herausgelöst - eine über die eigentliche "physiologische Traumatisierung" hinausgehende weitere experimentelle erfährt. Die Inkubation in einem synthetischen Medium schafft darüber hinaus ein Milieu, das dem physiologischen nur unvollständig entsprechen kann. Unter Einbeziehung beider Parameter (zusätzliche "Traumatisierung" und alteriertes Umgebungsmilieu) müssen die hier erzielten Ergebnisse erheblich relativiert werden.

LANDAU (101), FREYGANG (43), KETY (92) und REIVICH (141,142) entwickelten eine quantitative autoradiographische Methode zur Messung der lokalen Gewebskonzentration von chemisch inerten und diffusiblen radioaktiven Markierungsstoffen (Tracer). Konzentrationsangaben, die simultan für verschiedene Areale in Hirnserienschnitten gemacht werden konnten, wurden gleichgesetzt mit der Durchblutungsgröße dieser Gebiete.

Die Autoren gaben jedoch selbst zu bedenken, daß die Methode zur Untersuchung des zerebralen Zuckerstoffwechsels nur bedingt anzuwenden sei, weil die normalen Substrate des Energiestoffwechsels  $O_2$  und Glukose eine zu kurze physiologische Halbwertszeit besitzen und deshalb zu schnell zu Kohlendioxid konvertieren, was seinerseits abdiffundiert.

SOKOLOFF (160;161;162;163;164;165) entwickelte ein mathematisch-statistisches Modell, das diese Fehlermöglichkeiten ausschließen sollte. Durch die Applikation eines Antimetaboliten (2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat), der nach Einschleusung in den Stoffwechselweg keine weitere Veränderung erfährt, ergab sich aus der zerebralen Konzentrationsbestimmung ein konstanter Faktor, der auf den Glukosemetabolismus zurückzurechnen gestattet. Die Anwendung dieses sehr einfachen Modells wird in Anbetracht der Komplexität des Hirngewebstoffwechsels vom Autor selbst in vielen Einzelheiten eingeschränkt. So sei beispielsweise die Anwendungsmöglichkeit nur dann gegeben, wenn Hirnareale mit homogenen Eigenschaften vorliegen. Die Homogenität bezieht sich auf die Durchblutung, die Transportrate von Glukose und  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose vom Blut in das Hirn, die Konzentration von Glukose und  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose sowie die Mengen von Glukose-6-Phosphat und  $^{14}\text{C}$ -D-Deoxyglukose-6-Phosphat. Diese Voraussetzungen sind in einem Hirn mit gravierender Dysfunktion nicht vollständig erfüllt (3;7;47;61;103;104;107;127;130;144;145;146). Die klinische Erfordernis liegt gerade in der Korrelation der Dysfunktion mit der geänderten Stoffwechselrate.

Eine andere Prämisse der statistisch-mathematischen Analyse von SOLOKOFF war, daß die Gesamtmenge an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose in einem einzigen Kompartiment inhomogenen Hirngewebes vorliegen muß. Für besondere Fragestellungen, die mit einer sehr engen eingrenzbaeren Lokalisation verbunden sind, ergeben sich sicherlich die skizzierten Voraussetzungen.

Tabelle 19: Vergleich mikro-absorptionsphotometrisch bestimmter mittlerer optischer Dichtewerte ( $\overline{O.D.}$ ) von Autoradiogrammen traumatisierter und nicht traumatisierter Hirngewebsschnitte.

| $\overline{X}$ EXTINKTION |                |                                            |                                        |                    | mittlere O. D. = $\overline{O. D.}$ |       | mittlere O. D. = $\overline{O. D.}$ |       | $\overline{X}$ EXTINKTION |                                        |                                            |                |                |
|---------------------------|----------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|---------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|----------------|----------------|
|                           |                |                                            |                                        |                    | TRAUMATISIERTE<br>HIRNE             |       | NICHT TRAUMATISIERTE<br>HIRNE       |       |                           |                                        |                                            |                |                |
| Hirn<br>Nummer            | Mess<br>Nummer | Gesamt-<br>aktivität<br>( $\mu\text{Ci}$ ) | Schnitt-<br>dicke<br>( $\mu\text{m}$ ) | Expozeit<br>(Tage) | RINDE                               | MARK  | RINDE                               | MARK  | Expozeit<br>(Tage)        | Schnitt-<br>dicke<br>( $\mu\text{m}$ ) | Gesamt-<br>aktivität<br>( $\mu\text{Ci}$ ) | Mess<br>Nummer | Hirn<br>Nummer |
| 165                       | STA-1/177      | 50                                         | 100                                    | 3                  | 54,90                               | 44,95 | 32,92                               | 21,83 | 3                         | 100                                    | 50                                         | STA-1/103      | 68             |
| 164                       | STA-1/176      | 50                                         | 75                                     | 3                  | 52,25                               | 36,14 | 34,11                               | 22,28 | 3                         | 75                                     | 50                                         | STA-1/102      | 67             |
| 163                       | STA-1/175      | 50                                         | 50                                     | 3                  | 41,12                               | 29,10 | 21,90                               | 16,49 | 3                         | 50                                     | 50                                         | STA-1/101      | 66             |
| 162                       | STA-1/174      | 50                                         | 25                                     | 3                  | 23,29                               | 17,44 | 16,54                               | 10,77 | 3                         | 25                                     | 50                                         | STA-1/100      | 65             |
| 153                       | STA-1/165      | 75                                         | 100                                    | 3                  | 74,22                               | 53,08 | 61,84                               | 48,57 | 3                         | 100                                    | 75                                         | STA-1/126      | 111            |
| 152                       | STA-1/164      | 75                                         | 75                                     | 3                  | 61,17                               | 45,24 | 58,52                               | 37,22 | 3                         | 75                                     | 75                                         | STA-1/125      | 110            |
| 151                       | STA-1/163      | 75                                         | 50                                     | 3                  | 50,18                               | 33,45 | 45,57                               | 29,39 | 3                         | 50                                     | 75                                         | STA-1/124      | 109            |
| 150                       | STA-1/162      | 75                                         | 25                                     | 3                  | 29,37                               | 19,49 | 29,17                               | 16,25 | 3                         | 25                                     | 75                                         | STA-1/123      | 108            |
| 146                       | STA-1/158      | 100                                        | 100                                    | 3                  | 95,05                               | 92,78 | 71,68                               | 55,76 | 3                         | 100                                    | 100                                        | STA-1/138      | 123            |
| 149                       | STA-1/161      | 100                                        | 75                                     | 3                  | 80,14                               | 67,65 | 56,00                               | 42,98 | 3                         | 75                                     | 100                                        | STA-1/137      | 122            |
| 148                       | STA-1/160      | 100                                        | 50                                     | 3                  | 69,32                               | 60,51 | 44,96                               | 29,93 | 3                         | 50                                     | 100                                        | STA-1/136      | 121            |
| 147                       | STA-1/159      | 100                                        | 25                                     | 3                  | 44,00                               | 39,60 | 26,48                               | 17,25 | 3                         | 25                                     | 100                                        | STA-1/135      | 120            |

Für jedes direkt korrelierte Wertepaar (mittlere Extinktion,  $\overline{O.D.}$ -Werte) aus Autoradiogrammen traumatisierter und nicht traumatisierter Hirnschnitte wurden die Faktoren Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ , Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte und Expositionszeit der Schnitte gegenüber der Photoemulsion konstant gehalten, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

Die mittleren Extinktionen ( $\overline{O.D.}$ ) von Autoradiogrammen traumatisierter Hirnschnitte liegen sowohl für Areale des Rinden- als auch des Markbereichs über dem Extinktionsniveau vergleichbarer Bereiche in Autoradiogrammen nicht traumatisierter Hirnschnitte.

Da die gemessene optische Dichte ( $\overline{O.D.}$ ) in der hier angewandten Meßmethode in linearer Abhängigkeit zu der im autoradiographierten Hirnschnitt inkorporierten Aktivität an  $^{14}\text{C-D-Glukose}$  und  $^{14}\text{C-D-Glukosemetaboliten}$  steht, darf angenommen werden, daß der Eingriff in den physiologischen zerebralen Glukosestoffwechsel (Elektrotrauma mit konsekutiv entwickeltem Hirnödem) den zerebralen Glukoseumsatz auf eine höhere Stufe anhebt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Der Vergleich von Autoradiogrammen von Hirnschnitten traumatisierter und nicht traumatisierter Ratten erbrachte folgendes Ergebnis:

In vergleichbaren Autoradiogrammen (Schnittdicke, Expositionszeit, zugeführte Gesamtaktivität  $^{14}\text{C-D-Glukose}$ ) liegen die absorptionsphotometrisch gemessenen Extinktionen von Autoradiogrammen traumatisierter Tiere jeweils höher als die von Autoradiogrammen nicht traumatisierter Tiere.

Dies gilt für Rindenbereiche in gleicher Weise wie für Markbereiche. Da der Bereich des Traumas selbst durch

eine stark verminderte bzw. aufgehobene  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose bzw.  $^{14}\text{C}$ -D-Glukosemetabolitanreicherung gekennzeichnet ist und somit im Autoradiogramm als gering geschwärzter Bereich zur Darstellung kommt, muß die in Autoradiogrammen traumatisierter Tiere gemessene Extinktionszunahme auf eine überproportionale  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose- und -metabolitanreicherung im verbliebenen funktionstüchtigen Hirngewebe zurückzuführen sein.

#### IV. DISKUSSION

Wenn ein Organ ausschließlich Glukose als Substrat für die Energiegewinnung verbraucht (69;119;138;139;182), dann ist aus der Glukoseaufnahme - dem Energieverbrauch - auf den Funktionsgrad des Gewebes zu schließen.

Wenngleich ein normaler Substratumsatz des Gewebes keineswegs mit einer "gesunden Funktion" gleichgesetzt werden kann, so läßt sich umgekehrt dennoch folgern, daß eine "gesunde Funktion" ohne einen normalen Substratumsatz nicht wahrscheinlich ist. Sollte sich in der Weiterführung des Gedankens darstellen lassen, daß eine Krankheit durch einen verminderten oder gesteigerten Stoffwechselumsatz gekennzeichnet ist, dann wäre die Möglichkeit gegeben, aus einer Normalisierung der Stoffwechselrate auf eine Gesundheitstendenz des Gewebes zu schließen - bzw. aus der Beeinflussung der Stoffwechselrate auf eine therapeutische Effektivität der eingeleiteten Maßnahmen (5;12;33;38;40;53;70;85;87;100;102;109;132;137;140;153;156;159;167;179).

Erste Ergebnisse zu diesen Zusammenhangsfragen wurden von KETY-SCHMIDT (88;89;91;92), SCHEINBERG (152), LASSEN (106), EKLÖF (32) und GJEDDE (48) gemacht, die mit der Bestimmung des zerebralen Energiestoffwechsels in toto keine Korrelation von lokalen Stoffwechselalterationen zu bestimmten Krankheitsbildern in vivo machen konnten. Von LOWRY (114,115) und HAWKINS (63) wurde eine Methode entwickelt, die zu einer Differenzierung des lokalen Glukosewechsels im geschlossenen System führt.

Für die Betrachtung müssen die interessierenden Bereiche aus einem Gewebszylinder herausgestanzt und in bestimmten Medien inkubiert werden. Es liegt auf der Hand, daß ein vorgeschädigtes Hirn (z.B. Hirnödem) - mit veränderten Stoffwechselfparametern aus dem Gewebszusammenhang herausgelöst - eine über die eigentliche "physiologische Traumatisierung" hinausgehende weitere experimentelle erfährt. Die Inkubation in einem synthetischen Medium schafft darüber hinaus ein Milieu, das dem physiologischen nur unvollständig entsprechen kann. Unter Einbeziehung beider Parameter (zusätzliche "Traumatisierung" und alteriertes Umgebungsmilieu) müssen die hier erzielten Ergebnisse erheblich relativiert werden.

LANDAU (101), FREYGANG (43), KETY (92) und REIVICH (141,142) entwickelten eine quantitative autoradiographische Methode zur Messung der lokalen Gewebskonzentration von chemisch inerten und diffusiblen radioaktiven Markierungsstoffen (Tracer). Konzentrationsangaben, die simultan für verschiedene Areale in Hirnserienschnitten gemacht werden konnten, wurden gleichgesetzt mit der Durchblutungsgröße dieser Gebiete.

Die Autoren gaben jedoch selbst zu bedenken, daß die Methode zur Untersuchung des zerebralen Zuckerstoffwechsels nur bedingt anzuwenden sei, weil die normalen Substrate des Energiestoffwechsels  $O_2$  und Glukose eine zu kurze physiologische Halbwertszeit besitzen und deshalb zu schnell zu Kohlendioxid konvertieren, was seinerseits abdiffundiert.

SOKOLOFF (160;161;162;163;164;165) entwickelte ein mathematisch-statistisches Modell, das diese Fehlermöglichkeiten ausschließen sollte. Durch die Applikation eines Antimetaboliten (2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat), der nach Einschleusung in den Stoffwechselweg keine weitere Veränderung erfährt, ergab sich aus der zerebralen Konzentrationsbestimmung ein konstanter Faktor, der auf den Glukosemetabolismus zurückzurechnen gestattet. Die Anwendung dieses sehr einfachen Modells wird in Anbetracht der Komplexität des Hirngewebsstoffwechsels vom Autor selbst in vielen Einzelheiten eingeschränkt. So sei beispielsweise die Anwendungsmöglichkeit nur dann gegeben, wenn Hirnareale mit homogenen Eigenschaften vorliegen. Die Homogenität bezieht sich auf die Durchblutung, die Transportrate von Glukose und  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose vom Blut in das Hirn, die Konzentration von Glukose und  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose sowie die Mengen von Glukose-6-Phosphat und  $^{14}\text{C}$ -Deoxyglukose-6-Phosphat. Diese Voraussetzungen sind in einem Hirn mit gravierender Dysfunktion nicht vollständig erfüllt (3;7;47;61;103;104;107;127;130;144;145;146). Die klinische Erfordernis liegt gerade in der Korrelation der Dysfunktion mit der geänderten Stoffwechselrate.

Eine andere Prämisse der statistisch-mathematischen Analyse von SOLOKOFF war, daß die Gesamtmenge an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose in einem einzigen Kompartiment inhomogenen Hirngewebes vorliegen muß. Für besondere Fragestellungen, die mit einer sehr engen eingrenzbaren Lokalisation verbunden sind, ergeben sich sicherlich die skizzierten Voraussetzungen.

Bei multiokulären oder großflächigen Verletzungen des Hirngewebes bzw. bei Störungen des Stoffwechsels führt die unterschiedliche Verteilung von intra- und extrazellulärer und die Vielfalt der morphologisch differenten Zelltypen (143) hingegen zu einer derartigen Inhomogenität, daß die Grundbedingungen der Analyse nicht gegeben sind.

Der nach SOKOLOFF gewebsgebundene Faktor, der sich aus der  $^{14}\text{C}$ -Deoxy-D-Glukose im Hirngewebe ergibt, weil eben dieser Antimetabolit im Intermediärstoffwechsel keine weiteren Änderungen erfährt (Trapping) (142;166;177;188), wird neuerdings von HAWKINS (64) in Frage gestellt. Er konnte nachweisen, daß Deoxy-Glukose-6-Phosphat über eine in Neuronen mit substantieller Aktivität aktive Glukose-6-Phosphat-Phosphatase zu 1% - 3% aus dem Hirngewebe eliminiert wird. Dieser Untersuchungsbefund hat insofern wesentliche Bedeutung, weil der Divisor in der SOKOLOFF'schen Operationsgleichung zur Bestimmung des lokalen Glukoseumsatzes mit zunehmender Versuchsdauer kleiner wird, und die Möglichkeit auf die Rückrechnung des Glukosemetabolismus in einen entsprechend großen Fehlerbereich gelangt.

Eine unseres Erachtens wesentlich größere Einschränkung der Anwendbarkeit dieser Methode zur Bestimmung des zerebralen Glukosestoffwechsels besteht darin, daß lediglich die Stufe der Glukoseaufnahme - d.h. die Einschleusung der Glukose in die Zelle und die Phosphorylierungsgeschwindigkeit auf der ersten Stufe des Embden-Meyerhoff-Weges - erfaßt werden und so dokumentiert werden soll, in welcher Weise pathologische Stoff-

wechselvorgänge stattfinden. Die Gesamtheit des nachgeschalteten Zuckerstoffwechsels wie die Glykolyse, die Glukoneogenese, die Glykogenolyse, der Pentose-Phosphat-Shunt, die Umwandlung der Zucker in Aminosäuren und damit der zuckerabhängige Eiweiß- und Strukturstoffwechsel, bleiben unerfaßt, obwohl alle diese Faktoren bestimmte Ebenen des Energie- und Leistungsstoffwechsels kennzeichnen und krankheitsbedingte Störungen dokumentieren können. Zur Erfassung aller stoffwechselcharakteristischen Parameter müßte daher ein Radioisotop der Glukose Verwendung finden, das alle spezifischen Glukosestoffwechselschritte qualitativ und quantitativ unbeeinträchtigt mitmacht. In der  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose liegt ein Tracer vor, der diese Forderungen erfüllt.

Die  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose verteilt sich nach Applikation homogen über den Blutweg in den Körpergeweben, wird in die Zellen aufgenommen und phosphoryliert. Der radioaktive Kohlenstoff liegt ebenso wie der nicht markierte als Metabolit des Energiestoffwechsels oder als strukturelle Komponente des Intermediärstoffwechsels vor. Ein Teil des radioaktiven Kohlenstoffes wird als  $^{14}\text{CO}_2$  über die Lunge als Stoffwechselendprodukt abgeraucht bzw. in Form verschiedener Stoffwechselendprodukte über die Niere ausgeschieden. Der Verlust an radioaktivem  $^{14}\text{C}$  in Form von  $^{14}\text{CO}_2$  ist dabei nach HAWKINS (64) eine Funktion des Gesamtglukosestoffwechsels (G) und des Gehaltes an radioaktivem Kohlenstoff ( $^{14}\text{C}$ ). HAWKINS beschreibt den Verlust mit der Formel

$$\text{Verlust} = -G \cdot k \cdot (^{14}\text{C})$$

und gibt den Wert für die gemessene Konstante k mit 0,04 g/ $\mu\text{mol}$  an.

Für den Nachweis der gewebsinkorporierten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität müssen spezifische Verfahren angewendet werden, wie die Autoradiographie (64;65;86;142;160;161;163), das Beta-Proportional-Zählrohr und die Beta-Kamera (82). Keines dieser Meßverfahren kann für sich allein betrachtet eine Aussage über die Zugehörigkeit des radioaktiven Kohlenstoffes zu einem bestimmten Metaboliten machen (142;160;162;163). Dieser Umstand ist aber auch nicht notwendigerweise als Nachteil aufzufassen, weil im Gegensatz zur  $^{14}\text{C}$ -Deoxy-D-Glukose nicht nur ein einziger, sondern alle die Stoffwechselschritte dokumentiert werden, die ihren Ausgang einzig und allein von der  $^{14}\text{C}$ -Glukose nehmen, d.h. die Subsumierung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität kann niemals höher sein als die Gesamtmenge der applizierten  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose. Die Messung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Gewebe nach Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose kann somit als integrierendes Verfahren zum Nachweis der lokalen gewebsgebundenen Kohlenstoffkonzentration herangezogen werden. Die Identifizierung der Substanzen, die markierten Kohlenstoff enthalten, ist bei besonderem Interesse aus Gewebsextrakten mit entsprechenden Nachweisverfahren leicht möglich.

Obgleich die grundsätzlichen methodischen Voraussetzungen gegeben zu sein scheinen, ist eine Zusammenfassung der einzelnen Analysenverfahren zu einer Methode, die an die klinische Fragestellung adaptiert ist, bisher nicht ausgearbeitet worden. Wir haben unsere Aufgabe darin gesehen, die methodischen und technischen Voraussetzungen einzeln und im Zusammenschluß zu methodischen Nachweisverfahren zu überprüfen, um künftig in die Lage versetzt zu sein, den Nutzen bzw. die Effektivität therapeutischer Maßnahmen zu überprüfen. Bei der Verwendung

der Autoradiographie als Nachweisverfahren war dabei insbesondere darzustellen, ob die Applikation des Tracers mit der gewebssinkorporierten  $^{14}\text{C}$ -Menge und dem Schwärzungsgrad der Autoradiographie - in Abhängigkeit von der Expositionsdauer - quantitativ zu korrelieren war.

Wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Nachweisverfahrens war, daß im Anschluß an die Applikation der  $^{14}\text{C}$ -Glukose ein Zeitraum gegeben sein mußte, in dem ein Verteilungsgleichgewicht des Tracers im Organismus erreicht wurde. Die Metabolisierungsrate der applizierten  $^{14}\text{C}$ -Glukose durfte in einem bestimmten Zeitraum nicht zu hohen Konzentrationsunterschieden der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Gewebe führen, weil in Abhängigkeit vom Versuchsablauf gewisse Zeitungenauigkeiten nicht zu unterscheiden waren - andererseits aber eine unterschiedliche  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Gewebe bei gleicher Expositionsdauer zu unterschiedlichen Schwärzungsgraden des autoradiographischen Materials führt. Besonders unter dem Aspekt der statistisch abzusichernden Vergleichsuntersuchungen war es wünschenswert, die kritischen Zeitgrenzen des Steady State zu kennen. Nach bolusartiger intravenöser Injektion einer definierten Menge  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose konnte durch Bestimmung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den einzelnen Geweben mit Hilfe der Flüssigkeitszintillationszählung gezeigt werden, daß die Affinität der Glukose zum Hirngewebe größer ist als die zu jedem anderen Organgewebe.

Weiterhin konnte auf diesem Wege gezeigt werden, daß der Abfall der Konzentration innerhalb einer Zeitreihe

in allen Organen ohne wesentliche Unterschiede verläuft. Entgegen dieser sofort einsetzenden - anfangs schnellen, dann langsamer werdenden - Aktivitätsmin- derung steigt die Exhalation des radioaktiven Kohlen- stoffes als  $^{14}\text{CO}_2$  mit einer Latenz an. Innerhalb der ersten Stunde nach Applikation wird ein maximales Plateau erreicht, das ungefähr für den gleichen Zeit- raum anhält und in der nachfolgenden Zeit wesentlich langsamer abfällt, als es angestiegen war. Diese in einem Zeitraum von 2 Stunden gegenläufigen Aktivitäts- kurven zeigen, daß die Freisetzung der Energie aus dem aufgenommenen Substrat mit der Menge an aufgenommenem Substrat nicht identisch ist, so daß die Freisetzung der Energie aus der  $^{14}\text{C}$ -Glukose ein Teilproblem bei der Glukoseverwertung darstellt, und die Einschleusung der applizierten Substanz in den Funktions- und Struktur- stoffwechsel als anderes Teilproblem gewertet werden muß. Die Tatsache, daß innerhalb einer Stunde die Aus- scheidung an  $^{14}\text{CO}_2$  gleich bleibt, bietet die Gewähr dafür, daß die Versuchsbedingungen bei verschiedenen Tieren identisch sind. Eine schnelle Änderung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Beimengung zur Gesamtmenge an  $\text{CO}_2$  wäre gleich- bedeutend mit einer hohen Eliminationsrate gewesen, so daß für jeden Augenblick des Versuches unterschied- liche Bedingungen gültig gewesen wären.

Bei der Ermittlung dieser Daten erschien besonders interessant, daß sowohl nach intravenöser bolusartiger Injektion als auch nach enteraler Applikation der An- teil an  $^{14}\text{CO}_2$  an der gesamten  $\text{CO}_2$ -Exhalation den gleichen Konzentrationsanstieg zeigte. Daraus ergibt sich, daß die Elimination der  $^{14}\text{C}$ -Glukose aus dem Blut zunächst

in der Leber erfolgt und dann in einem gleichmäßigen Prozentsatz zur Glukosemenge für den Gesamtstoffwechsel des Organismus abgegeben wird. Durch die Bestimmung des Quotienten aus der gesamten exhaliierten  $\text{CO}_2$ -Menge und der spezifischen  $^{14}\text{CO}_2$ -Menge konnte weiterhin gezeigt werden, daß jede Steigerung der Energiegewinnung bei gleichbleibendem Quotienten zwischen  $^{14}\text{CO}_2$  und  $\text{CO}_2$  erfolgte, d.h. daß der Anteil der  $^{14}\text{C}$ -Glukose an der Gesamtglukoseumsetzung gleich blieb.

Statistisch signifikante Unterschiede im Kurvenverlauf ergaben sich bei den einzelnen Tieren nicht, obwohl bei gleichbleibender Applikationsmenge die Rate der Gewebsinkorporation und auch die Menge der  $^{14}\text{C}$ -Exhalation unterschiedlich waren, während die Änderung der Konzentration innerhalb der einzelnen Tiergruppen identisch blieb. Besonders nach enteraler Applikation sind diese Unterschiede verständlich, weil die Resorptionsbedingungen wesentlich vom Füllungszustand des Magen-Darm-Kanals und von der Narkosetiefe abhängen. Dieses Phänomen findet aber auch nach intravenöser Applikation in dem unterschiedlichen Muskeltonus und Ventilationsverhalten der Tiere - als individuelle Reaktion auf den Glukosereiz - seine Erklärung.

Aufgrund dieser Voruntersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß bei Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose ein Indikator zur Verfügung steht, mit dem unterschiedliche zerebrale Stoffwechselraten erfaßt werden können. Die Voraussetzung dafür ergibt sich erstens

aus der qualitativen Identität des Tracers mit dem für den zerebralen Energiestoffwechsel ausschließlich erforderlichen Substrat Glukose, zweitens aus der quantitativen Konformität der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität mit der Summe der Glukosemetaboliten. Wie auch die unterschiedliche  $^{14}\text{C}$ -Aktivität verschiedener Hirnareale über den  $^{14}\text{C}$ -Gehalt meßbar ist, mußten bei Änderung der Gesamtstoffwechselrate des Organs weitere Untersuchungen zeigen, ob diese Meßgröße in der notwendigen Meßempfindlichkeit und Meßsicherheit so erfaßt werden kann, daß sich krankheitsbedingte Änderungen der Stoffwechselrate beschreiben lassen.

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der gewebssinkorporierten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität hat man das Verfahren der Autoradiographie verwendet. "Autoradiography is a marriage of the arts of histology and photography" (George BOYD). Das primäre Ziel, erkrankte bzw. in ihrer Stoffwechselrate veränderte Gewebsbereiche darzustellen, setzt gleichermaßen eine histologische Betrachtungsmöglichkeit wie die Dokumentation des Indikators auf quasi zellulärer Ebene voraus. Das Prinzip dieser Methode liegt darin, eine radioaktive Strahlenquelle in Kontakt mit einer photoempfindlichen Schicht zu bringen (11). Die radioaktive Strahlung bewirkt beim Auftreffen auf eine photoempfindliche Schicht eine Änderung der Gitterstruktur der vorhandenen Silberbromidkristalle, die in einem nachgeschalteten Entwicklungs- und Fixierungsprozeß zur Bildung sogenannter Silberkörner führt. Die Summe der Silberkörner repräsentiert dann das reale Bild - bzw. die Lokalisation der Silberkörner entspricht der Position der radioaktiven Strahlungsquelle im Gewebe.

Die Zahl der umgewandelten Silberbromidkristalle ist entweder durch eine mikroskopische Auszählung zu erfassen - weil die Umwandlung zu einer punktförmigen Schwärzung der photoempfindlichen Schicht führt - , oder die Messung erfolgt durch eine Subsumierung der punktförmigen Schwärzungen, die densitometrisch in Form graduierter Grautönungen darstellbar ist (11; 26; 27; 28; 29; 30; 34; 35; 37; 39; 42; 59; 77; 80; 83; 134; 141). Je höher die Anzahl der umgewandelten Silberbromidkristalle ist, umso intensiver ist der Schwärzungsgrad, d.h. von einer quantitativ definierten Menge durchfallenden Lichtes wird mit zunehmender Zahl an umgewandelten Silberbromidkristallen eine immer größere Menge absorbiert. Das linear ansteigende Verhältnis zwischen Extinktion und spezifischer Aktivität ist damit Grundlage für die qualitativen und quantitativen Betrachtungen der  $^{14}\text{C}$ -Verteilung im Hirngewebe (30; 39). Von einem definierten Zeitpunkt ab kann jedoch die Linearität dieser Beziehung nicht mehr gegeben sein, da die Menge der umwandelbaren Silberbromidkristalle in einer endlichen Zahl vorgegeben ist und die Umwandlung in Abhängigkeit von Zeit und Strahlungsintensität gleichmäßig fortschreitet, bis sie vollständig vollzogen ist. Zur Validisierung der Aussagen über die  $^{14}\text{C}$ -Verteilung im Hirngewebe mußte daher sichergestellt werden, daß im Untersuchungszeitraum die Linearität dieser Beziehung gegeben war.

Die spezifische Aktivität eines in der Autoradiographie verwendeten Radioisotopes sollte möglichst hoch sein, und zwar wegen der geringen Masse (Schichtdicke der histologischen Schnitte) und der nicht endlos ausdehnbaren Expositionsdauer der Strahlenquelle gegenüber

dem photoempfindlichen Film (13;14;21;37;122;135;141). Als gebräuchlicher Wert für die Autoradiographie mit beta-emittierenden  $^{14}\text{C}$ -Radioisotopen wird eine spezifische Aktivität von  $1 - 10^2 \text{ mCi/mmole}$  angegeben (37). Weiterhin sollte die Reichweite der emittierten Strahlung des Radioisotopes der räumlichen Ausdehnung der Strahlenquellen (in diesem Falle der Schnittdicke der untersuchten Hirnschnitte) wie auch den Parametern der absorbierenden Photoemulsion angepaßt sein (178). Eine ideale Kombination ist gegeben, wenn die Reichweite der Strahlung, die Schnittdicke des histologischen Präparates und die Schichtdicke der Photoemulsion so aufeinander adaptiert sind, daß alle radioaktiven Quanten in der Emulsion absorbiert werden. Ist die Photoemulsion unverhältnismäßig dick, so führt die Streustrahlung zu einer zusätzlichen Schwärzung des Filmmaterials, wohingegen eine zu dünne Emulsionsschicht die auftretende Strahlungsenergie nicht vollständig zu absorbieren vermag, so daß der Schwärzungsgrad der Strahlungsenergie nicht entspricht.

In unserer Versuchsanordnung wurde eine spezifische Aktivität von  $2 - 4 \text{ mCi/mmole}$   $^{14}\text{C}$ -Glukose verwendet, so daß die geforderten Grenzen eingehalten wurden. Eine Abschätzung der Reichweite der  $^{14}\text{C}$ -Beta-Strahlung ergibt - unter Zugrundelegung des Gewichtes des gefriergetrockneten Gewebes bei einer mittleren Flächendichte von  $0,9 \times 10^{-2} \text{ g/cm}^2$ , - daß ca. 90% der emittierten Betastrahlung den verwendeten Röntgenfilm erreichen. Die Schichtdicke des verwendeten Kodak-X-Omat-S Röntgenblattfilmes beträgt  $13 \mu\text{m}$  bei einer

Dicke des PVC-Trägermaterials von 175  $\mu$ m. Die Versuchsbedingungen erfüllen damit die für die Dokumentation notwendigen Voraussetzungen.

Die Exposition des gefriergetrockneten und auf einer PVC-Folie aufgezogenen Hirngewebsschnittes gegenüber der Photoemulsion wurde in handelsüblichen Aluminiumkassetten vorgenommen, weil dieses Verfahren - eine modifizierte Sandwich-Technik in Anlehnung an die Methode von KINTER und WILSON (93), HOROWITZ und FENICHEL (75;76;77) mehrere Vorteile bietet. Bei diesem Vorgehen wird erstens der Abstand zwischen Präparat und Film über die ganze zu exponierende Fläche des Hirnschnittes gleich gehalten, so daß in Anbetracht der Reichweite der Betastrahlen gleiche räumliche Voraussetzungen gegeben sind, ohne daß ein starker lokaler Druck ausgeübt wird, der zu Fehlern in der photographischen Emulsion führen könnte (13;14;18;21;39). Zweitens werden Verschiebungen des Hirnschnittes auf der Photoemulsion auch während längerer Expositionszeit in diesen Kassetten ausgeschlossen. Nach Erstellung des Autoradiogrammes wurde eine Trennung von Präparat und Filmschicht durchgeführt, so daß die Densitometrie des Autoradiogrammes durch das stark lichtabsorbierende Gewebe nicht unspezifisch beeinflusst werden konnte (21;34;35;60;141;151;168).

Zur Quantifizierung der densitometrischen Messungen von Autoradiogrammen wird in der Literatur (42;59;141) vielfach die Schwärzung, die durch die Betastrahlung eines Standardpräparates hervorgerufen wird, mit der

Schwärzung des Gewebsschnittes direkt korreliert und mit der spezifischen Aktivität im Gewebe gleichgesetzt (Flächenaktivität;  $\text{DPM}/\text{mm}^2$ ). Da diese Korrelation aufgrund der verschiedenen Schichtdicken und der daraus resultierenden unterschiedlichen Selbstabsorption der Betastrahlung im Gewebe und im Standardpräparat nicht zutreffen muß, wurden in der vorliegenden Arbeit sämtliche Autoradiogramme von Hirnschnitten zusammen mit Standardpräparaten bekannter spezifischer Aktivität abgefertigt, um Vergleiche zu ermöglichen. Es konnte für die Kombination von NEN-Metacrylatstandard und Hirngewebsschnitten bei der Densitometrie der Autoradiogramme gezeigt werden, daß eine Verwendung von Standardpräparaten nicht sinnvoll ist, wenn die gemessene mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) direkt mit der spezifischen Aktivität ( $\text{DPM}/\text{mg}$ ) beider Strahlenquellen korreliert werden soll. Bei gleichen Expositionszeiten (1 und 3 Tage) und bei gleicher spezifischer Aktivität der Strahlenquelle ist die vom NEN-Standard hervorgerufene Filmschwärzung jeweils höher als die vom Hirnpräparat erzeugte, d.h. das Hirngewebe hat im Vergleich zum Metacrylatstandard eine höhere Beta-Absorptionsrate. Wird diese Tatsache nicht berücksichtigt, so sind die Angaben über die spezifische Aktivität des Gewebes zu niedrig. Dieser Fehler wird umso größer, je höher die mittlere Extinktion ist, die zur spezifischen Aktivität korreliert werden soll.

Auswertung und Messung der an einem Autoradiogramm gemessenen Schwärzungsintensitäten beinhalten noch eine weitere Fehlerquelle, die in der Elektronik, Akustik und Optik als "Bildrauschen" beschrieben wird, d.h. die im Informationsträger (Autoradiogramm) enthaltenen

Daten sind nicht alle auf die eigentlichen Informationen (Signale) zurückzuführen. Die Alteration der Photoemulsion beruht auf unspezifischen Einflüssen (4;16;21;34;35;60;141;151;168;30;39;37). Wir haben diese Veränderungen bei der Auswertung der Autoradiogramme berücksichtigt, indem die Untergrundschwärzung als individueller Wert in die Messung mit einbezogen wurde, d.h. der Untergrund wurde als mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) für jedes Autoradiogramm gesondert bestimmt und von den Signaldaten automatisch subtrahiert. Da unserem Densitometer eine PDP-12-Laborrechner nachgeschaltet war, konnte dieser Vorgang bei jeder Einzelmessung durchgeführt werden. Lagen die Signaldaten (Filmschwärzung durch Wechselwirkung mit der Radioaktivität des autoradiographierten Präparates) in ihrer Intensität im Bereich des Untergrundes, so war dies am Ergebnis einer Meßwertverteilung von nahezu 100% Transmission erkenntlich (Frequenzhistogramme). Lag demgegenüber ein eindeutig diskriminierbares Autoradiogramm vor, so ergab sich eine Meßwertverteilung, die das Maximum ihrer Transmission bei einem Wert unter 95% hatte. Eine weitere Besonderheit der Meßanordnung war dadurch gegeben, daß über eine Schwellenwertveränderung nur solche Meßwerte zur Darstellung zu bringen waren, die im Bereich einer gewünschten Extinktion lagen. Bei entsprechender Programmierung konnte durch den Laborrechner ermittelt werden, welche Flächenintegrale mit gleicher Metabolisierungsrate vorlagen.

Zur Validisierung densitometrischer Meßergebnisse mußte abgegrenzt werden, in welchem zeitlichen Bereich minimale und maximale Strahlungsenergien nach Exposition

linear mit dem Schwärzungsgrad des verwendeten photosensiblen Materials korrelierten (21;34;35;60;141;151;168). Nur bei Vorliegen einer linearen Beziehung war anzunehmen, daß die Menge an  $^{14}\text{C}$ -Gewebsinkorporation und der Grad der Schwärzungsintensität miteinander vergleichbare Stoffwechselparameter sind. Bei Verwendung von Standardpräparaten bekannter spezifischer Aktivität (NEN-Metacrylatstandard) zeigte sich, daß die gemessene mittlere Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) im Autoradiogramm linear zu steigenden Expositionszeiten und zu steigenden spezifischen Aktivitäten korreliert ist. Bei hohen spezifischen Aktivitäten (mehr als 3000 DPM/mg) und langen Expositionszeiten der Autoradiogramme (mehr als 2 Tage) traten Sättigungerscheinungen der Photoemulsion auf, die darin begründet lagen, daß keine weiteren entwickelbaren Silberbromidkristalle in der Photoemulsion zur Verfügung stehen. Die Korrelation ist nicht linear. Bis in diesen Bereich sind demzufolge Gewebe mit nicht bekannter Inkorporation an Strahlungsintensität densitometrisch quantifizierbar. Die Ermittlung der mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) verschiedener Hirnbereiche führte - bei Berücksichtigung der methodischen Grenzbereiche - zu folgenden Feststellungen:

- 1.- Rindenbereiche kommen im Verhältnis zu Markbereichen stärker geschwärzt zur Darstellung und weisen insgesamt eine höhere mittlere Extinktion auf.
- 2.- Dieser Sachverhalt ist ein von unterschiedlichen Versuchstieren, Gesamtaktivitäten, Schnittdicken und Expositionszeiten unabhängiges Charakteristikum von Hirnautoradiogrammen.
- 3.- Die berechnete mittlere Extinktion ist ein für Rinde und Mark typischer Wert und steht in direktem Zusam-

menhang zur gewebesinkorporierten Aktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose. Sie kann somit als Parameter für die jeweilige Stoffwechselleistung herangezogen werden.

Ausgehend von der Tatsache, daß bei Verwendung von standardisierten Präparaten eine lineare Korrelation zwischen gemessener mittlerer Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) und spezifischer Aktivität gefunden wurde, sollte ein gleiches Verhalten auch bei der Vermessung von aktivitätstragenden Hirngewebsschnitten ermittelt werden. Aus diesem Grunde wurden aus Hirnschnitten unterschiedlicher Schnittdicke von Tieren mit unterschiedlichen Gesamtaktivitäten an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose Flächenstanzen entnommen und anschließend die spezifische Aktivität berechnet (spez. Aktivität  $\hat{=}$  DPM / mg Hirngewebe ). Die Korrelation der mittleren Extinktion mit der spezifischen Aktivität im Hirngewebe ergab, daß die Einflüsse individueller tierspezifischer Faktoren (Resorptionsquoten, Muskelaktivitätsniveau, Narkose usw.) nicht mehr nachweisbar waren. Für einen Bereich nicht zu hoher spezifischer Aktivität (weniger als 5000 DPM/mg Hirngewebe) wird eine lineare Korrelation zwischen mittlerer Extinktion und spezifischer Aktivität im Hirngewebe gefunden. Bei höheren spezifischen Aktivitäten unterliegt die Funktion - wie auch die der Standards - Sättigungserscheinungen der Photoemulsion. Ferner konnte gezeigt werden, daß Hirngewebe im Vergleich zu Metacrylatstandards eine höhere Beta-selbstabsorptionsrate ausweisen. Aus diesem Grunde mußte die spezifische Aktivität im Hirngewebe selbst experimentell ermittelt und mit der mittleren Extinktion korreliert werden.

Eine direkte Beziehung zwischen spezifischer Aktivität im Standard und im Hirn zu jeweils hervorgerufenen mittleren Extinktionen im Autoradiogramm war nicht möglich. Aus den Kurvenverläufen konnte letztlich berechnet werden, wie hoch die meßbare mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) sein muß, die von 1000 Zerfällen/h in der Photoemulsion bei Expositionszeiten von 1, 2 und 3 Tagen erzeugt wird. Damit war eine Standardisierung des Meßverfahrens insofern gelungen, als nunmehr für alle interessierenden Bereiche des Autoradiogrammes direkt über die Messung der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) eine quantitative Aussage über die lokale gewebsgebundene spezifische  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe gemacht werden konnte. Die Quantifizierbarkeit einer autoradiographischen Methode, die Flächenmessung und Vergleiche gestattet, ist in der Literatur bisher in dieser Weise nicht beschrieben (11;26;27;28;29;30;34;35;37;39;42;59;77;80;83;134;141).

Die Anwendung dieses Verfahrens zum Vergleich der Stoffwechselaktivität traumatisierter und nicht traumatisierter Rattenhirne zeigt, daß die Extinktionswerte von Autoradiogrammen traumatisierter Hirnschnitte für Areale des Rinden- wie auch des Markbereiches über dem Extinktionsniveau vergleichbarer Bereiche in Autoradiogrammen von nicht traumatisierten Hirnschnitten liegen. Da die gemessene mittlere optische Dichte in der hier angewandten Meßmethode in linearer Abhängigkeit zu der in autoradiographierten Hirnschnitten aktuellen spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität steht, muß angenommen werden, daß der Eingriff in den physiologischen zerebralen Glukosestoffwechsel durch die Traumatisierung den zerebralen Glukoseumsatz auf eine höhere Stufe anhebt (1;2;9;56;62;84;95;103;117;146;173;174;175). Dieser Befund deckt sich mit

zahlreichen Angaben in der Literatur, die aber mit wesentlich zeitaufwendigeren und technisch komplizierteren Verfahren bei geringerer spezifischer Meßgenauigkeit erarbeitet wurden (3;144;161;162;163;164;165;86;142;160;71). Es ergibt sich aus den vorgelegten Untersuchungsergebnissen, daß bei Berücksichtigung definierter Grenzwerte durch die densitometrische Auswertung von Autoradiogrammen von Hirnschnitten nach  $^{14}\text{C}$ -Inkorporation des Gewebes eine quantitative Beurteilung des Hirnstoffwechsels möglich ist. Änderungen des Hirngewebsstoffwechsels als Ausdruck eines Krankheitsgeschehens oder als Effekt nach therapeutischen Maßnahmen können damit erfaßt werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorgelegten Untersuchungen gehen davon aus, daß durch die quantitative Erfassung des spezifischen Gewebsstoffwechsels sowohl eine krankheitsbedingte Änderung der Stoffwechselrate dargestellt werden kann als auch die Möglichkeit geboten wird, die therapeutische Beeinflussung des Energie- und Leistungsstoffwechsels graduell zu beschreiben.

Unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -Glukose als energielieferndes Substrat des Hirngewebsstoffwechsels konnte nachgewiesen werden, daß bei bolusartiger Applikation eine zeitlich verzögerte und prozentual gleichmäßige Einschleusung des Substrates in den Stoffwechselprozeß erfolgt. Der Nachweis des Tracers im Gewebe wurde mit Hilfe der Autoradiographie geführt. Durch densitometrische Ausmessung von Hirnschnitten unterschiedlicher Schnittdicke, bei Applikation verschiedener  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten, bei zeitlich definierter Expositionsdauer konnte eine lineare Korrelation zwischen gewebsinkorporierter  $^{14}\text{C}$ -Menge, Schnittdicke und Expositionsdauer dargestellt werden. Aufgrund dieser Korrelationen ist ein direkter Rückschluß auf die spezifische Aktivität des Gewebes möglich, sofern Expositionsdauer und Schnittdicke des Präparates bekannt sind. Vergleichsuntersuchungen zwischen Rinde und Mark einerseits und zwischen traumatisiertem und nicht traumatisiertem Hirngewebe andererseits zeigen, daß die Metabolisierungsrate in der Hirnrinde ungleich höher ist als die im Markbereich, und daß die  $^{14}\text{C}$ -Inkorporation im traumatisierten Gesamthirn höher ist als im nicht traumatisierten. Während sich der Unterschied in der Metabolisierungsrate zwischen Hirnrinde

und Mark zwangsläufig aus der unterschiedlichen Zellzahl/Flächeneinheit zwischen Rinde und Mark ergibt, ist die unterschiedliche Energieumsatzrate zwischen funktionsgeschädigtem und normalem Hirngewebe ein spezifisches Charakteristikum der Erkrankung. Abgesehen davon, daß sich in der erhöhten  $^{14}\text{C}$ -Einlagerung keineswegs eine erhöhte Stoffwechselaktivität ausdrücken muß, bietet die Quantifizierungsmöglichkeit des  $^{14}\text{C}$ -Gewebsgehaltes die Basis für die Beurteilung therapeutischer Effekte, z.B. bei der Behandlung des traumabedingten Hirnödems.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ALEU, F.P., KATZMAN, R., TERRY, R.D.  
Fine structure and electrolyte analysis of cerebral edema induced by alkyltin intoxication.  
J.Neuropath.Exp.Neurol., 22, S. 403-413 (1963)
- 2 ALEU, F.P., EDELMAN, F.L., KATZMAN, R., SCHEINBERG, C.C.  
Ultrastructural and biochemical analysis in cerebral edema associated with experimental mouse gliomas.  
J.Neuropath.Exper.Neurol., 23, S. 253-263 (1964)
- 3 ALTENAU, L.L., KINDT, G.W., MCGAULEY, J.L.  
Comparison of glucose metabolism in normal brain and edematous brain surrounding an experimental brain neoplasm.  
Acta Neurol.Scand. (Suppl.), 56(64), S. 508-509 (1977)
- 4 ARROL, W.J., WILSON, E.J., EVANS, C., CHADWICK, J., EAKINS, J.  
Radioisotope Conf., 2, S. 59 (1954)
- 5 AUER, L.  
Beitrag zur Pathophysiologie des posttraumatischen Hirn-ödems.  
Wien. Klin. Wochenschr., 87(17), S. 556-560 (1975)

- 6 BACHELARD, H.S.  
Specificity and kinetic properties of monosaccharide uptake into guinea pig cerebral cortex in vitro.  
J. Neuroche., 18, S. 213-222 (1971)
- 7 BAETHMANN, A., BRENDDEL, W., KOCZOREK, Kh.-R., ENZENBACH, R.  
Pathophysiologie des traumatischen Hirnödems. Befunde und Hypothesen.  
Dtsch. Med. Wochenschr., 18, 95. Jg., S. 1020 (1970)
- 8 BAETHMANN, A.  
Letter: Spironolactone and aldosterone in brain edema.  
Dtsch. Med. Wochenschr., 100 (11), S. 570-571 (1975)
- 9 BENSON, V.M., McLAURIN, R.L.  
Traumatic cerebral edema.  
Arch. Neurol., 23(2), S. 179-186 (1970)
- 10 BIDDER, T.G.  
Hexose translocation across the blood-brain interface: configurational aspects.  
J. Neurochem., 15, S. 867-874 (1968)
- 11 BIENZ, K.A.  
Techniques and applications of autoradiography in the light and electron microscope.  
Microsc. Acta., 79(1), S. 1-22 (1977)

- 12 BINGHAM, W.G., PAUL, S.E.  
Effects of cold injury on six enzymes in rat brain.  
Arch. Neurol. (Chicago), 21, S. 649-660 (1969)
- 13 BOYD, G.A., BOARD, F.A.  
A preliminary report on histochemography.  
Science, 110, S. 586-588 (1949)
- 14 BOYD, G.A.  
Autoradiography in biology and medicine.  
Academic Press, New York, S. 146-154 (1955)
- 15 BRENDDEL, W., BAETHMANN, A.  
Die Deutung der Harnstoffwirkung beim Hirnödem.  
Langenbeck Arch. Klin. Chir., 313, S. 970-974 (1965)
- 16 CATCH, J.R.  
CARBON - 14 COMPOUNDS.  
Butterworth, London (1961)
- 17 ... J., MILLER, J.A.  
The effect of massive pulse steroid therapy on the water  
content of the rat brain.  
Transplantation, 14, S. 403-405 (1972)

- 18      CHERNICK, B., EVANS, A.  
The frequency distributions of silver grain counts  
from autoradiographs.  
Exp. Cell. Res., 53, S. 94-100 (1968)
- 19      CORMACK, D.V.  
The beta-ray sensitivity of autoradiographic stripping film.  
Br. J. Radiol., 28, S. 450-452 (1955)
- 20      COXON, R.V., WATERHOUSE, F.  
Glycerol metabolism and its relevance to cerebral oedema.  
Riv. Patol. Nerv. Ment., 91, S. 323-329 (1970)
- 21      DANIELS, J.S., GILMORE, S.A.  
Chemography associated with specific anatomic areas in  
autoradiographs of brain stems from adult rats.  
Brain Res., 98(2), S. 343-347 (1975)
- 22      DENDY, P.P.  
A method for the automatic estimation of grain densities  
in microautoradiography.  
Physics - Med. - Biol., 5, S. 131-135 (1960)
- 23      DIEMATH, H.E.  
Zur Behandlung des traumatischen Hirnödems.  
Z. Allgemeinmed., 51(19), S. 869-871 (1975)

- 24 DITTMANN, J., HERRMANN, H.-D.  
Examination of the metabolism of oedematous brain tissue.  
Acta Neurochir. (Wien), 26, S. 61-82 (1972)
- 25 DITTMANN, J., HERRMANN, H.-D., LOWE, F.  
Examination of the metabolism of oedematous brain tissue.  
Acta Neurochir. (Wien), 27, S. 63-85 (1972)
- 26 DÖRMER, O., BRINKMANN, W., STIEBER, A., STICH, W.  
Automatische Silberkornzählung in der Einzelzell-  
Autoradiographie.  
Klin. ther. Wschr., 44, S. 477-482 (1966)
- 27 DÖRMER, P.  
Auflichtphotometrische Untersuchungen zur Größe der  
Koinzidenz in der Autoradiographie mit Tritium.  
Histochemie, 8, S. 1-10 (1967)
- 28 DÖRMER, P.  
Erfahrung mit der photometrischen Silberkornzählung in  
der Autoradiographie.  
Leitz - Mitt. Wiss. Tech., 4, S. 74-80 (1967)
- 29 DÖRMER, P., BRINKMANN, W.  
Silberkornzählung mit dem Auflicht-Mikroskopphotometer.  
Ein Beitrag zur quantitativen Autoradiographie.  
Acta Histochem. Suppl., 8, S. 163-172 (1968)

- 30 DÖRMER, P., BRINKMANN, W.  
Quantitative  $^{14}\text{C}$ -Autoradiographie einzelner Zellen.  
Histochemie, 29, S. 248-274 (1972)
- 31 DUDLEY, R.A., PELC, S.R.  
Automatic grain counter for assessing quantitatively high-resolution autoradiographs.  
Nature, Lond., 172, S. 992-1015 (1953)
- 32 EKLÖF, B., LASSEN, N.A., NILSSON, L., NORBERG, K., SIESJÖ, B.K.  
Blood-flow and metabolic rate for oxygen in the cerebral cortex of the rat.  
Acta. Physiol. Scand., 88, S. 587-589 (1973)
- 33 ELLIOT, H.  
Proc. III. Int. Congr. Neurol. Surgery, Nr. 110,  
Amsterdam (1965)
- 34 ENGLAND, J.M., ROGERS, A.W.  
The statistical analysis of autoradiographs.  
I. Grain count distributions over uniformly labelled sources.  
J. Microscop., 92, S. 159-165 (1970)
- 35 ENGLAND, J.M., MILLER, R.G.  
The statistical analysis of autoradiographs.  
II. Theoretical aspects including methods for optimal allocation of measurement effort.  
J. Microsc., 92, S. 167-177 (1970)

- 36 ENZENBACH, R., SCHMIEDECK, P.  
Therapieeffekte beim Hirnödem.  
10. Neuro-Psychiatrisches Kolloquium Pula (1970)
- 37 EVANS, E.A.  
Purity and stability of radiochemical tracers in autoradiography.  
Methods Cell. Biol., 10, S. 291-324 (1975)
- 38 FAHY, T.J., IRVING, M.H., MILLAC, P.  
Severe head injuries. A six-year follow-up.  
Lancet, 2, S. 475-479 (1967)
- 39 FISCHER, H.A., WERNER, G.  
Eine Methode zur quantitativen Auswertung von Autoradiogrammen auf der Grundlage der Durchlicht-Mikro-Photometrie.  
Histochemie, 15, S. 84-95 (1968)
- 40 FISHMAN, R.A.  
Brain Edema.  
The New England Journal of Medicine, 293 (14),  
S. 706-711 (1975)
- 41 FLETCHER, J.W., GEORGE, E.A.  
Brain scans, dexamethasone therapy, and brain tumors.  
Jama, 232 (12), S. 1261-1263 (1975)

- 42      FREYER, K., HARTMANN, G.  
Auswertung von Autoradiogrammen und von Bildern biologischer Objekte mit dem elektronischen Bildauswertgerät " DENSITRON II ".  
Acta Histochem. (jena), 55 (2), S. 208-215 (1976)
- 43      FREYGANG, W.H., SOKOLOFF, L.  
Quantitative measurement of regional circulation in the central nervous system by the use of radioactive inert gas.  
Advance. Biol. Med. Phys., 6, S. 263-279 (1958)
- 44      FUCHS, E.C., MÜLLER-BUSCH, H. Ch.  
Was ist gesichert in der Therapie des Hirnödems ?  
Internist (Berlin), 17 (12), S. 638-644 (1976)
- 45      Experimentelle und Klinische Untersuchungen zur intravenösen Glyzerintherapie beim Hirnödem.  
Acta Neurochir. (Wien), 37 (1-2), S. 17-31 (1977)
- 46      GIBBS, E.L., LENNOX, W.G., NIMS, L.F., GIBBS, F.A.  
Arterial and cerebral venous blood; arterial-venous differences in man.  
J. Biol. Chem., 144, S. 325-332 (1942)
- 47      GIRKE, W.  
Pathophysiologie und Therapie des Hirnödems.  
Med. Klin., 69, S. 1-11 (1974)

- 48 GJEDDE, A., CARONNA, J.J., HINDFELT, B., PLUM, F.  
Whole-brain blood flow and oxygen metabolism in the rat  
during nitrous oxide anesthesia.  
AM. J. Physiol., 229, S. 113-118 (1975)
- 49 GO, K.G., VAN WOUDEBERG, F.  
The penetration of  $^{14}\text{C}$  urea and  $^3\text{H}$  water into the rat brain  
with cold-induced cerebral oedema.  
Acta Neurochir. (Wien), 21, S. 97-122 (1969)
- 50 GO, K.G., VAN WOUDEBERG, F.  
The effect of cortisone on cold-induced oedema in the rat  
brain.  
Neurochirurgie (Stuttg.), 14, S. 232-240 (1971)
- 51 GOBIET, W.  
Monitoring of intracranial pressure in patients with  
severe head injury.  
Neurochirurgia 20, S. 35-47 (1977)
- 52 GOFFERJE, H., LANDGRAF, H.  
Zur Osmo-Onkotherapie beim Hirnödem.  
Infusionstherapie, 2(5), S. 355-358 (1975)
- 53 GONATAS, N.K., ZIMMERMANN, H.M., LEVINE, S.  
Ultrastructure of inflammation with edema in the rat brain.  
Amer. J. Path., 42, S. 455-469 (1963)

- 54 GOLDSTEIN, D.J., WILLIAMS, M.A.  
Quantitative autoradiography: an evaluation of visual grain counting, reflectance microscopy, gross absorbance measurements and flying-spot microdensitometry.  
J. Microsc. (Engl.), 94, S. 215-239 (1971)
- 55 Quantitative assessment of autoradiographs by photometric reflectance microscope. An improved method using polarized light.  
Histochem. J., 6, S. 223-230 (1974)
- 56 GROMEK, A., MAJEWSKA, D., CZERNICKI, Z., JURKIEWICZ, J., KUNICKI, A.  
Biochemical properties of mitochondria in conditions of experimental brain edema in cats.  
Bull. Acad. Pol. Sci. (Biol.), 21, S. 701-708 (1973)
- 57 GULLBERG, J.E.  
A new change-over optical system and a direct recording microscope for quantitative autoradiography.  
Expl. Cell. Res. Suppl. 4, S. 222-230 (1957)
- 58 GULLBERG, J.E.  
Grain counting instrumentation.  
Lab. Invest. 8, S. 94-99 (1959)

- 59      HAAS, R.A., ROBERTSON, D.M.  
Microscope densitometer system for point measurement of  
autoradiographs.  
Stain Technol., 50(3), S. 137-141 (1975)
- 60      HACKMANN, C.R., ROSENGARD, S.  
Reproducible chemography in autoradiographs of rat brain.  
Experientia, 28, S. 492-493 (1972)
- 61      HAGER, H.  
Die feinere Cytologie und Cytopathologie des Nervensystems,  
dargestellt auf Grund elektronenmikroskopischer Befunde.  
Stuttgart: Fischer (1964)
- 62      HAAS, G.M., TAYLOR, C.B.  
A quantitative hypothermal method for the production  
of local injury of tissue.  
Arch. Path., 45, S. 563-580 (1948)
- 63      HAWKINS, R.A., MILLER, A.L., CREMER, J.E., VEECH, R.L.  
Measurement of the rate of glucose utilization by rat brain  
in vivo.  
J. Neurochem., 23(5), S. 917-923 (1974)
- 64      HAWKINS, R., HASS, W.K., RANSOHOFF, J.  
Advantages of 2 - <sup>14</sup>C-Glucose for regional cerebral  
glucose utilization.  
Acta Neurol. Scand. (Suppl.), 56(64), S. 436-437 (1977)

- 65      HAWKINS, R., HASS, W.K., RANSOHOFF, J.  
Cerebral blood flow, glucose utilization, and oxidative  
metabolism after bilateral reticular formation lesions.  
Acta Neurol. Scand. (Suppl.), 56(64), S. 240-241 (1977)
- 66      HEINITZ, M.  
Über die Anwendung membranotrop wirksamer Substanzen.  
Ther. Gegenw., 104, S. 329-334 (1965)
- 67      HERS, H.G., DE DUVE, C., BERTHET, J., DUPRET, L.  
Le système hexose-phosphatasique; existence d'une glucose  
-6- phosphatase spécifique dans le foie.  
Bull. Soc. Chim. Bio., 31, S. 1242-1253 (1949)
- 68      HERS, H.G., DE DUVE, C.  
Le système hexose-phosphatasique; répartition de l'ac-  
tivité glucose -6- phosphatasique dans les tissus.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 32, S. 20-29 (1950)
- 69      HERS, H.G., DE DUVE, C.  
Carbohydrate metabolisme.  
Annual. Rev. Biochem., 26, S. 149-180 (1957)
- 70      HERZOG, I., LEVY, W.A., SCHEINBERG, I.S.  
Biochemical and morphological studies of cerebral edema  
associated with intracerebral tumors in rabbits.  
J. Neuropath. Exp. Neurol., 24, S. 244-255 (1965)

- 71 HEVERT, S.
- Vergleich der Effektivität antiödematöser Behandlungsverfahren mit Hilfe der  $^{22}\text{Na}$ -Autoradiographie von Hirnschnitten.
- Inauguraldissertation, Gießen (1973)
- 72 HIMWICH, W.A., HIMWICH, H.E.
- Pyruvic acid exchange of brain.
- J. Neurophysiol., 9, S. 133-136 (1946)
- 73 HIMWICH, H.E.
- Brain metabolism and cerebral disorders.
- Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland (1951)
- 74 HINRICHSSEN, K.
- In discussion of paper by DÖRMER and BRINKMANN.
- Acta Histochem., Suppl., 8, S. 163-165 (1968)
- 75 HOROWITZ, S.B., FENICHEL, J.R.
- Analysis of glycerol - 3 - H transport in the frog-oocyte by extractive and radioautographic techniques.
- J. Gen. Physiol., 51, S. 703-730 (1968)
- 76 HOROWITZ, S.B., FENICHEL, J.R.
- Analysis of sodium transport in the amphibian-oocyte by extractive and radioautographic techniques.
- J. Cell. Biol., 8, S. 249-275 (1974)

- 77      HOROWITZ, S.B.  
The ultra-low temperature autoradiography fo water  
and its solutes.  
Methods Cell. Biol., 8, S. 249-275 (1974)
- 78      HORTON, R.W., MELDRUM, B.S., BACHELARD, H.S.  
Enzymic and cerebral metabolic effects of 2-deoxy-D-glucose.  
J. Neurochem., 21, S. 507-520 (1973)
- 79      IBRAHIM, M.Z.M., MORGAN, R.S.  
Histochemistry of the neuroglia and myelin in experimental  
cerebral oedema.  
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 28, S. 91-98 (1965)
- 80      ISERMANN, K.  
Äquidensitometrie in der Autoradiographie.  
Naturwissenschaften, 61(9), S. 403 (1974)
- 81      JACOBSEN, J., HARPER, A.M., McDONALD, D.G.  
The effect of oxygen at 1 and 2 atmospheres on the blood  
flow and oxygen uptake of cerebral cortex.  
Surg. Gynec. Obstet. 119, S. 737 (1964)
- 82      JONES, S.C., ACHERMANN, R.H., OJEMANN, R.J.  
The time course and distribution of  $^{11}\text{C}$  in brain following  
intravenous injection of  $^{11}\text{C}$ -glucose.  
Acta Neurol. Scand. (Suppl.), 56(64), S. 450-451 (1977)

- 83 KALBERER, F.  
A new method of macroautoradiography.  
Advances Tracer Meth., 3, S. 139-147 (1966)
- 84 KALSBECK, J.E., CUMINGS, J.N.  
Experimental edema in the rat and at brain.  
J. Neuropath. exp. Neurol., 22, 237-247 (1963)
- 85 KATZMAN, R., ALEU, R., WILSON, C.  
Arch. Neurol., 9, S. 178-187 (1963)
- 86 KENNEDY, C., DES ROSIERS, M.H., REIVICH, M., SHARPE, F.,  
SOKOLOFF, L.  
Mapping of functional neural pathways by autoradiographic  
survey of local metabolic rate with  $^{14}\text{C}$ -deoxyglycose.  
Science, 187, S. 963-972 (1976)
- 87 KESTERSON, J.W., CARLTON, W.W.  
Histopathologic and enzyme histochemical observations of  
the cuprizone-induced brain edema.  
Exp. Mol. Pathol., 15, S. 82-96 (1971)
- 88 KETY, S.S., SCHMIDT, C.F.  
Nitrous oxide method for quantitative determination of  
cerebral blood flow in man; theory, procedure, and normal  
values.  
J. Clin. Invest., 27, S. 476-483 (1948)

89 KETY, S.S.

Human cerebral blood flow and oxygen consumption as related to aging.

J. Chron. Dis. 3, S. 478-586 (1956)

90 KETY, S.S.

The cerebral circulation in man.

Triangle; The Sandoz Journal of Medical Science (Basel), 3(2), S. 45-52 (1957)

91 KETY, S.S.

Determinants of tissue oxygen tension.

Fed. Proc., Balt. (16/3), S. 666-671 (1957)

92 KETY, S.S.

Measurement of local blood flow by the exchange of an inert, diffusible substance.

Meth. Med. Res., 8, S. 228-236 (1960)

93 KINTER, W.B., WILSON, T.H.

Autoradiographic study of sugar and amino acid absorption by everted sacs of hamster intestine.

J. Cell. Biol., 25, S. 19-39 (1965)

94 KIRSCH, R.

Indikationen und Erfahrungen mit einem intravenös applizierten Aldosteron-Antagonisten (Soldactone<sup>R</sup>).

Praxis, 64(44), S. 1414-1417 (1975)

- 95 KLATZO, I., PIRAUX, A., LASKOWSKI, E.J.  
The relationship between edema, blood-brain barrier  
and tissue elements in a local brain edema.  
J. Neuropath. Exper. Neurol., 17, S. 548-564 (1958)
- 96 KLATZO, I.  
Neuropathological aspects of brain edema.  
J. Neuropath. Exper. Neurol., 26, S. 1-12 (1967)
- 97 KLATZO, I.  
Brain Edema (Schürmann, K., Hrsg.).  
Berlin-Heidelberg-New York; Springer (1973)
- 98 KOPCZYNSKI, S., KURZAJ, E.  
Clinical evaluation of the action of dexamethasone.  
Anaesth. Resusc. Intensive Ther., 3(2), S. 157-163 (1975)
- 99 KRAMER, G.  
Zur medikamentösen Regulierung des Wasserhaushaltes  
beim Hirnödem.  
Med. Welt, 42, S. 2238-2244 (1964)
- 100 LABORIT, H., WEBER, B., BARON, C.  
Die Rolle der katecholaminergischen Reaktion, der Hyper-  
lactacidämie und des  $p\text{CO}_2$  im Hirnstoffwechsel und in der  
Pathogenese des Hirnödems; in: G. Kienle: Hydrodynamik,  
Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt im Liquor und im  
Nervensystem.  
G. Thieme, Stuttgart (1967)

- 101 LANDAU, W.H., FREYGANG, W.H., ROWLAND, L.P., SOKOLOFF, L.,  
KETTY, S.S.  
Local circulation of living brain; values in unanesthetized  
and anesthetized cat.  
Trans. Am. Neurol. Ass., 80, S. 125-129 (1955)
- 102 LANDOLT, A.M.  
Das Hirnödem.  
Ther. Umsch., 30, S. 591-596 (1973)
- 103 LANGFITT, T.W., TANNANBAUM, H.M.  
The etiologi of acute brain swelling following ex-  
perimental head injury.  
J. Neurosurg., 24, S. 47-56 (1966)
- 104 LANGFITT, T.W.  
Etiology and management of acute brain swelling.  
W. Virginia Med. J., 62, S. 49-55 (1966)
- 105 LANNER, G., ARGYROPOULOS, G.  
Tierexperimentelle und klinische Studien beim Hirnödem.  
Arzneim. Forsch., 24 (10), S. 1680-1686 (1974)
- 106 LASSEN, N.A., MUNCK, O.  
Cerebral blood flow in man determined by use of radio-  
active crypton.  
Acta Physiol. Scand., 33, S. 30-49 (1955)

- 107 LEE, J.C. und BAKAY, L.  
Ultrastructural changes in the edematous CNS.  
II. Cold induced edema.  
Arch. Neurol. (Chicago), 14, S. 36-49 (1966)
- 108 LEE, M.C., MASTRY, A.R.  
Ineffectiveness of dexamethasone for treatment of experimental cerebral infarction.  
Stroke, 5, S. 216-218 (1974)
- 109 LEVINE, S., ZIMMERMANN, H.M., WENK, E.J., GONATAS, N.K.  
Experimental leucoencephalopathies due to implantation of foreign substances.  
Amer. J. Path., 42, S. 97-117 (1963)
- 110 LEVINE, S., TORRELIO, M.  
Cerebral inflammation and edema: A model in rats for testing antiinflammatory drugs.  
Exp. Neurol., 56(2), S. 361-369 (1977)
- 111 LONG, D.M., HARTMANN, J.F., FRENCH, A.L.  
The response of experimental cerebral edema to glucosteroid administration.  
Neurosurg., 24, S. 843-854 (1966)
- 112 LONG, D.M., MAXWELL, R.E., FRENCH, A.L.  
The effects of glucosteroids upon cold induced brain edema.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 30(4), S. 680-697 (1971)

- 113 LONG, D.M., MAXWELL, R.E.  
The effects of glucosteroids upon cold induced brain edema.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 32(2), S. 245-255 (1973)
- 114 LOWRY, O.H., PASSONNEAU, J.K., HASSELBERGER, F.X.  
Effect of ischemia on known substrates and cofactors  
of the glycolytic pathway in brain.  
J. Biol. Chem., 239, S. 18-30 (1964)
- 115 LOWRY, O.H., PASSONNEAU, J.K.  
The relationship between substrates and enzymes of  
glycolysis in brain.  
J. Biol. Chem., 239, S. 31-42 (1964)
- 116 MADDOCK, S., HAWKINS, J.E., HOLMES, E.  
Inadequacy of substances of 'glucose cycle' for maintenance  
of normal cortical potentials during hypoglycemia produced  
by hepatectomy with abdominal evisceration.  
Am. J. Physiol., 125, S. 551-565 (1939)
- 117 MAGEE, N., STONER, H.B., BARNES, J.M.  
The experimental production of oedema in the central  
nervous system of the rat by triethyl-tin compounds.  
J. Path. Bact., 73, 107-124 (1957)
- 118 MAXWELL, R.E., LONG, D.M., FRENCH, L.A.  
The effects of glucosteroids on experimental cold-induced  
brain edema.  
J. Neurosurg., 34(4), S. 477-487 (1971)

- 119     McILWAIN, H.  
        Biochemistry and the central nervous system.  
        3rd. Ed., S. 58, London: J. and A. Churchill Ltd. (1966)  
        - and TRESIZE, M.A.  
        The glucose, glycogen, and aerobic glycolysis of isolated  
        cerebral tissues.  
        Biochem. J., 63, S. 250-257 (1956)
- 120     MERTZ, M.  
        Bestimmung der Silberkorngroße in Autoradiogrammen bei  
        Auflicht und Durchlicht.  
        Histochemie, 17, S. 128-134 (1969)
- 121     MÜKE, R., ETMANSKI, G.  
        Klinische Erfahrungen mit Dexamethason zur Hirnödem-  
        prophylaxe.  
        Acta Neurochir. (Wien), 28, S. 331-339 (1973)
- 122     NEELY, J.E., COMBS, J.W.  
        Variation in the autoradiographic technique:  
        I. Emulsion-developer combinations assessed by photometric  
        measurement of single silver grains.  
        J. Histochem. Cytochem., 24(10), S. 1057-1067 (1976)
- 125     NELSON, S.R.  
        Effect of drugs on experimental brain edema in mice.  
        J. Neurosurg., 41, S. 193-199 (1974)

- 124 NEUFELD, D., HERRMANN, H.-D., LOEW, F.  
The influence of dexamethasone on the blood-brain barrier  
and water content in experimental brain oedema.  
Acta Neurochir. (Wien), 30(1-2), S. 51-57 (1974)
- 125 OLDENDORFF, W.H.  
Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and  
hexoses after arterial injection.  
Am. J. Physiology, 221, S. 1629-1639 (1971)
- 126 PAPPIUS, H.M., DAYES, L.A.  
Hypertonic urea.  
Arch. Neurol. (Chicago), 13, S. 395-402 (1965)
- 127 PATBERG, W.R., GO, K.G.  
Isolation of edema fluid in cold-induced cerebral edema  
for the study of colloid osmotic pressure, lactate  
dehydrogenase activity, and electrolytes.  
Exp. Neurol., 54(1), S. 141-147 (1977)
- 128 PAUL, J.S., MATEYKO, G.C.  
Solutions of the equations necessary for automated  
autoradiograph grain counting.  
Digest of Sixth International Conference on Medical,  
Electronic, and Biological Engineering, Tokyo, S. 231-  
240 (1965)

- 129 PAUL, B.  
Das dosierte 2,4 Dinitrophenol-Ödem (2,4 DNP-Ödem) am Hund.  
Ein Modell zur Erzeugung unterschiedlich stark ausgebildeter  
Hirnödeme.  
Z. Exp. Chir., 4, S. 46-59 (1971)
- 130 PAUL, B.  
Möglichkeiten der Hirnödembehandlung.  
Dtsch. Gesundheitswesen, 27, S. 2386-2391 (1972)
- 131 PELC, S.R.  
On the question of automatic or visual grain counting.  
Lab. Invest., 8, S. 127 (1959)
- 132 POTTER, J.M.  
Head injuries today.  
Postgrad. Med. J., 43, S. 574-581 (1967)
- 133 PRASANNAN, K.G., SUBRAHMANYAM, K.  
Effect of insulin on the synthesis of glycogen in cerebral  
cortical slices of alloxan diabetic rats.  
Endocrinology, 82, S. 1-6 (1968)
- 134 PRENSKY, W.  
Automated image analysis in autoradiography.  
Exp. Cell. Res., 68, S. 388-394 (1971)

- 135     PRESCOTT, KAREN, M., DAVID, G.S.  
          The use of Polaroid-Land-Film in Radioautography.  
          Anal. Biochem., 57, S. 232-239 (1974)
- 136     PRESTON, K., NORGREN, P.E.  
          Automatic autoradiographic grain counting using the  
          Cellscan TM System.  
          Ann. N.Y. Acad. Sci., 157, S. 393-409 (1969)
- 137     PROBST, CH.  
          Pathologische, diagnostische und therapeutische Probleme  
          beim Hirnödemen aus neurochirurgischer Sicht.  
          Schweiz. Rundschau Med. (Praxis), 65, S. 948-956 (1976)
- 138     QUADBECK, G.  
          Blut - Hirnschranke und Hirnernährung.  
          Münch. med. Wschr., 104, S. 24-26 (1962)  
  
          - und HELMICHEN, H.  
          Die Blut - Hirnschranke.  
          D.M.W., 82, 1377-1382 (1957)
- 139     QUASTEL, J.H.  
          Carbohydrate metabolism in the nervous system.  
          In: The structure and function of nervous tissue  
          (Ed.: G.H. Bourne), Vol. III, p. 62-107, New York  
          and London: Academic Press, 1969

- 140 RANSCHOFF, J., RANDT, C.T.  
Proc. III: Int. Congr. Neurol. Surgery Amsterdam,  
Nr. 110, 137 (1965)
- 141 REIVICH, M., JEHLE, J., SOKOLOFF, L.  
Measurement of regional cerebral blood flow with anti-  
pyrine  $^{14}\text{C}$  in awake cats.  
Journal of Applied Physiology, Vol. 27, No. 2, S. 296  
- 300 (1969)
- 142 REIVICH, M., SOKOLOFF, L., KENNEDY, C., DES ROSIERS, M.  
An autoradiographic method for the measurement of  
local glucose metabolism in the brain.  
Brain Work, Academic Press, S. 337-384 (1975)
- 143 REULEN, H.J., BRENDDEL, W.  
Das Ödem der grauen Substanz. In: G. Kienle:  
Hydrodynamik, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt  
im Liquor und im Nervensystem.  
G. Thieme, Stuttgart 1967
- 144 REULEN, H.J., MEDZIHRADSKY, F., ENZENBACH, R.  
Electrolytes, fluids, and energy metabolism in human  
cerebral edema.  
Arch. Neurol., 21, S. 517-525 (1969)

- 145 REULEN, H.J., FENSKE, K., SCHÜRMANN, K.  
Electrolytes, fluids, and energy metabolism in traumatic brain edema.  
J. Neurosurg. Psychiatr., 33, S. 714-715 (1970)
- 146 REULEN, H.J., STEUDE, K., BRENDL, W., HILBER, C., PRUSINER, S.  
Energetische Störung des Kationentransportes als Ursache des intrazellulären Hirnödems.  
Acta Neurochir. (Wien), 22, S. 129-166 (1970)
- 147 REULEN, H.J., HADJIDIMOS, A., SCHÜRMANN, K.  
The effect of dexamethason on water and electrolyte content and on r-CBF in perifocal brain edema in man.  
In: H.J. REULEN, K. SCHÜRMANN: Steroids and brain edema, S. 239-252. Springer, Berlin - Heid. - New York (1972)
- 148 RIX, E., SCHILLER, A.  
Freeze - Fracture - Autoradiography.  
Histochemistry, 50(2), S. 91-101 (1977)
- 149 ROGERS, A.W.  
A simple photometric device for the quantitation of silver grains in autoradiographs of tissue sections.  
Expl. Cell. Res., 24, S. 228-235 (1961)
- 150 ROGERS, A.W.  
Techniques of Autoradiography.  
Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1967)

- 151 SAWICKI, W., BLATON, O.  
Correction of autoradiographic grain count in respect  
to precisely calculated background.  
Histochemie, 26, S. 67-73 (1971)
- 152 SCHEINBERG, P., STEAD, E.A.  
Cerebral blood flow in male subjects as measured by  
nitrous oxide technique. Normal values for blood flow,  
oxygen utilization, glucose utilization, and peripheral  
resistance, with observations on effect of tilting and  
anxiety.  
J. Clin. Invest., 28, S. 1163-1171 (1949)
- 153 SCHMIEDEX, P., BAETHMANN, A., SIPPEL, G., OETTINGER, W.,  
ENZENBACH, R., MARGUTH, F., BRENDEL, W.  
Energy state and glycolysis in human cerebral edema.  
J. Neurosurg., 40, S. 251-264 (1974)
- 154 SCHMIEDEK, P., OETTINGER, W., BAETHMANN, A.  
Aldosterone - a new therapeutic principle for the treatment  
of brain oedema in man.  
Acta Neurochir. (Wien), 30(1-2), S. 59-68 (1974)
- 155 SCHMIEDEK, P., OETTINGER, W.  
A new approach to the treatment of brain edema: mineral-  
corticoids.  
Br. J. Surg., 60(4), S. 316 (1974)

- 156      SCHRÖDER, J.M., WECHSLER, W.  
          Ödem und Nekrose in der grauen und weißen Substanz beim  
          experimentellen Hirntrauma. (Licht- und elektronen-  
          mikroskopische Untersuchungen).  
          Acta Neuropath. (Berlin), 5, S. 82-111 (1965)
- 157      SHAPIRO, W.R., POSNER, J.B.  
          Corticosteroid hormones. Effects in an experimental  
          brain tumor.  
          Arch. Neurol., 30(3), S. 217-221 (1974)
- 158      SIEGEL, B.A., STUDER, R.K.  
          Steroid therapy of brain edema.  
          Arch. Neurol., 27(3), S. 209-212 (1972)
- 159      SIEGENTHALER, W.  
          Klin. Pathophysiologie.  
          G. Thieme Verlag Stuttgart, S. 932-1004 (1973)
- 160      SOKOLOFF, L.  
          Blood Flow and Metabolism.  
          Churchill-Livingstone, S. 15.3 - 15.8 (1975)
- 161      SOKOLOFF, L.  
          (1 -  $^{14}\text{C}$ ) - 2 - deoxy - D - Glucose method for measuring  
          local cerebral glucose utilization. Mathematical analysis  
          and determination of the 'lumped' constants.  
          Neurosciences Res. Program. Bull., 14(4), S. 466-468 (1976)

- 162 SOKOLOFF, L.

Measurement of local glucose utilization and its use in mapping local functional activity in the central nervous system. In: Sweet W. et al., ed. Neurosurgical treatment in psychiatry, pain, and epilepsy. Baltimore, Univ. Park. Press, S. 111-121 (1977), W3 Wo 5384 (1975)

- 163 SOKOLOFF, L., REIVICH, M., KENNEDY, C.

The  $^{14}\text{C}$ -deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat.

J. Neurochem., 28(5), S. 897-916 (1977)

- 164 SOKOLOFF, L.

Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system.

J. Neurochem., 29(1), S. 13-26 (1977)

- 165 SOKOLOFF, L.

Local cerebral energy metabolism: its relationships to local functional activity and blood flow.

Ciba Found Symp., 56, S. 171-197 (1978)

- 166 SOLS, A., CRANE, R.K.

Substrate specificity of brain Hexokinase.

J. Biol. Chem., 210(2), S. 581-595 (1954)

- 167 STRUCK, G., UMBACH, W.  
Vergleichende elektronenoptische Untersuchungen an der  
menschlichen Hirnrinde vor und nach Ödemtherapie.  
Virchows Arch. Path. Anat., 337, S. 317-327 (1964)
- 168 STUMPF, W.E.  
Too much noise in the Autoradiogram ?  
Science, 163, S. 958-959 (1969)
- 169 TAUGNER, R., IRAVANY, J.  
Short-lived radioisotopes and autoradiography radioisotopes  
from reactors.  
Vol. II. Intern. Atomic Energy Agency Vienna, S. 187-199 (1963)
- 170 TAYLOR, J.H., McMASTER, R.D., CALUYA, M.F.  
Autoradiographic study of incorporation of  $P^{32}$  into RNA  
at the intracellular level.  
Expl. Cell. Res., 9, S. 460-470 (1955)
- 171 TAYLOR, J.H.  
Autoradiography at the cellular level.  
Physical Techniques in Biological Research (Ed. by G. Oster  
and A.W. Palister), Vol. 3, p. 545, Academic Press, N.Y. (1956)
- 172 TOLLES, W.E.  
Methods of automatic quantification of microautoradiographs.  
Lab. Invest., 8, S. 99 (1969)

- 173 TORACK, R.M., TERRY, R.D., ZIMMERMANN, H.M.  
The fine structure of cerebral fluid accumulation.  
II. Swelling produced by triethyltin poisoning and its  
comparison with that in human brain.  
Amer. J. Path. 36, S. 237-287 (1960)
- 174 TORACK, R.M.  
The relationship between ATP-activity and triethyltin  
toxicity in the production of the cerebral edema of the  
rat.  
Amer. J. Path., 46, S. 245-261 (1965)
- 175 TORNHEIM, P., McLAURIN, R.L.  
Traumatic Cerebral Edema: An Experimental Model.  
McLaurin RL, ed. Head Injuries. New York, Grune & Stratton,  
1976, Wz. C 155 E (1975) h
- 176 TORNHEIM, P.A., McLAURIN, R.L.  
Effect of dexamethasone on the brain edema of cranical Impact.  
Surg. Forum, 27(62), S. 485-487 (1976)
- 177 TOWER, D.B.  
The effects of 2-deoxy-D-Glucose on metabolism of slices  
of cerebral cortex incubated in vitro.  
J. Neurochem. (Lond.), 3(2), S. 185-205 (1958)
- 178 VAN DER BORCHT, O.  
Basis nuclear aspects of autohistoradiography.  
Acta Histochem. (Jena), Suppl. 8, S. 15-21 (1968)

- 179 WECHSLER, W., RIVERSON, E., SCHRÖDER, J.M., KLEIHUES, P.F.,  
PALMEIRO, J.F., HOSSMANN, K.A.  
Electron microscopic observations on different models of  
acute experimental brain edema. In: Brain Edema Eds.  
J. Klatzo and F. Seitelberger. Wien-New York: Springer (1967)
- 180 WEEDEN, R.P.  
Autoradiography of freeze-dried sections: Studies of con-  
centrative transport in kidney.  
In: Roth, Stumpf: Autoradiography of diffusible substances.  
New-York/London: Academic Press, S. 147-160 (1969)
- 181 WEEDEN, R.P., THIER, S.O.  
Intrarenal distribution of nonmetabolized amino acids in vivo.  
Amer. J. Physiol., 220, S. 507-512 (1971)
- 182 WEIL-MALHERBE, H.  
Der Energiestoffwechsel des Nervengewebes und sein Zusammen-  
hang mit der Funktion.  
3. Colloquium, Ges. Physiol. Chem. 26./27.4.52, Mosbach/Baden,  
S. 41-65, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer (1952)  
- Der Energiestoffwechsel des Gehirns.  
Münch. Med. Wschr., 104, S. 21-24 (1962)
- 183 WELTON, M.E.  
Some factors affecting the results obtained with Kodak  
AR 10 stripping film in autoradiography.  
J. Photogr. Sci., 17, S. 157-165 (1969)

- 184 WESEMANN, W., EGGERT, H.R.  
Die Behandlung des experimentellen Hirnödems mit Mineral-  
cortikoiden, Glucosteroiden und Aldosteron-Antagonisten.  
- Persönl. Mitteilung -
- 185 WESEMANN, W.  
The Pathogenesis of cerebral edema.  
Gemeinsamer Kongreß der Belgischen und Deutschen Gesellschaft  
für Neurochirurgie vom 11. - 14.9.1966 in Knocke/Belgium
- 186 WESEMANN, W., PIA, H.W.  
Aldadiene - Kalium in der Neurochirurgie.  
In: Postoperative Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaus-  
haltes.  
E.S. Büch. (ed.) F.K. Schattauer Verl. Stuttg. New Y. (1968)
- 187 WESEMANN, W.  
Zur Pathogenese und Therapie des Hirnödems (klinische,  
chemische und tierexperimentelle Untersuchungen).  
Habil.-Schrift, Gießen (1972)
- 188 WICK, A.N., DRURY, D.R., NAKADA, H.J., WOLFE, J.B.  
Localization of the primary metabolic block produced by 2-  
deoxyglucose.  
J. Biol. Chem., 224(2), S. 963-969 (1957)
- 189 WISSINGER, J.P., FRENCH, L.A.  
The use of dexamethasone in control of cerebral oedema.  
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 30(6), S. 588 (1967)

## VII. VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

- Seite -

### 1.) T A B E L L E N

|                    |                                                                                                                                                                                           |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Tabelle 1 :</u> | Wiederfindungsrate an $^{14}\text{C}$ -D-Glukose nach i.V. Injektion von 100 $\mu\text{Ci}$ $^{14}\text{C}$ -D-Glukose; Organextrakte.                                                    | 18 |
| <u>Tabelle 2 :</u> | Absolutaktivitäten (DPM) in Hirn, Leber, Niere und Muskulatur der Ratte nach i.v. Verabreichung von 25 $\mu\text{Ci}$ / 50 $\mu\text{l}$ $^{14}\text{C}$ -D-Glukose; Zeitverlauf.         | 21 |
| <u>Tabelle 3 :</u> | Zusammenstellung von Autoradiogrammen von Hirnschnitten unterschiedlicher Gesamtaktivitäten an $^{14}\text{C}$ -D-Glukose, Schnittdicke und Expositionszeit; Untergrunddiskriminierung.   | 46 |
| <u>Tabelle 4 :</u> | Aufschlüsselung der spezifischen $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten (DPM/mg) und der zugeordneten $\beta$ -Oberflächen-Emissionen ( $\text{DPM}/\text{mm}^2$ ).                                 | 59 |
| <u>Tabelle 5 :</u> | Darstellung der mikro-absorptionsphotometrisch gemessenen $\overline{\text{O.D.}}$ (Schwärzung) von Autoradiogrammen der NEN-Standards.                                                   | 64 |
| <u>Tabelle 6 :</u> | Berechnung der mittleren Extinktionen ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) für Bereiche unterschiedlicher Silberkorndichteverteilung im Hirnautoradiogramm. Gegenüberstellung von Rinde und Mark. | 73 |

|                     |                                                                                                                                                                                                |    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Tabelle 7 :</u>  | Vergleich der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) von Rinde und Mark von unterschiedlich spezifizierten Hirnautoradiogrammen.                                                           | 76 |
| <u>Tabelle 8 :</u>  | Mittlere Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) von Autoradiogrammen eines Hirnschnittes vor und nach erfolgter Flächenstanzung.                                                                     | 81 |
| <u>Tabelle 9 :</u>  | Zusammenstellung der Ergebnisse der Wägung von Flächenstanzen aus Hirnschnitten unterschiedlicher Hirne und identischer Schnittdicke.                                                          | 83 |
| <u>Tabelle 10 :</u> | Mittlere Gewichte von Flächenstanzen aus Hirnschnitten mit 25, 50, 75 und 100 $\mu$ m Schnittdicke.                                                                                            | 85 |
| <u>Tabelle 11 :</u> | Darstellung der mittleren Hirngewichte auf einer Flächenstanze in Abhängigkeit von der Schnittdicke der gestanzten Hirnschnitte.                                                               | 86 |
| <u>Tabelle 12 :</u> | Darstellung der theoretisch berechneten Gewichte der Flächenstanzen in Abhängigkeit zur Schnittdicke der gestanzten Hirnschnitte im Vergleich zu den experimentell ermittelten Stanzgewichten. | 87 |
| <u>Tabelle 13 :</u> | Darstellung der DPM von Flächenstanzen aus Hirnschnitten identischer Schnittdicke und unterschiedlicher Menge an applizierter Gesamtaktivität $^{14}\text{C}$ -D-Glukose.                      | 88 |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <u>Tabelle 14 :</u> | Darstellung der spezifischen $^{14}\text{C}$ -Aktivität (DPM/mg Hirngewebe) in Flächenstanzen von Hirnschnitten identischer Schnittdicke und unterschiedlicher der Ratte applizierten Menge an $^{14}\text{C}$ -D-Glukose.               | 89  |
| <u>Tabelle 15 :</u> | Autoradiogramm eines Hirnschnittes mit den dazugehörigen Werten der mittleren Extinktion ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) für Rinde und Mark.                                                                                                | 92  |
| <u>Tabelle 16 :</u> | Darstellung der spezifischen $^{14}\text{C}$ -Aktivität in 42 Hirngewebsschnitten unterschiedlicher Spezifikation.                                                                                                                       | 113 |
| <u>Tabelle 17 :</u> | Berechnung der mittleren optischen Dichte ( $\overline{\text{O.D.}}$ ), hervorgerufen durch eine spez. $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe von 1000 Zerfällen pro Stunde und Milligramm (DPH/mg) in der photoempfindlichen Schicht. | 117 |
| <u>Tabelle 18 :</u> | Darstellung der mikro-absorptionsphotometrisch bestimmten mittleren Extinktionen von Autoradiogrammen von Hirnschnitten traumatisierter Tiere.                                                                                           | 121 |
| <u>Tabelle 19 :</u> | Vergleich mikro-absorptionsphotometrisch bestimmter mittlerer optischer Dichtewerte ( $\overline{\text{O.D.}}$ ) von Autoradiogrammen traumatisierter und nicht traumatisierter Hirngewebsabschnitte.                                    | 129 |

2.) A B B I L D U N G E N

- Seite -

|                      |                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Abbildung 1 :</u> | Schematischer Aufbau der Traumatisierungsvorrichtung.                                                                                                                                                                | 9  |
| <u>Abbildung 2 :</u> | Exhalationsmeßplatz E - Lab 3135/13.                                                                                                                                                                                 | 14 |
| <u>Abbildung 3 :</u> | Darstellung der Konzentrationsverläufe von $^{14}\text{CO}_2$ und $\text{CO}_2$ in der Expirationsluft der Ratte in Abhängigkeit von der Zeit nach i.v. Injektion von 100 $\mu\text{Ci}$ $^{14}\text{C}$ -D-Glukose. | 15 |
| <u>Abbildung 4 :</u> | Absolutaktivitäten (DPM) in Hirn, Leber, Niere und Muskulatur der Ratte nach i.v. Injektion von 25 $\mu\text{Ci}/50 \mu\text{l}$ $^{14}\text{C}$ -D-Glukose - Graphische Darstellung der Zeitverlaufes.              | 19 |
| <u>Abbildung 5 :</u> | Versuchsdurchführung - Schematischer Überblick.                                                                                                                                                                      | 41 |
| <u>Abbildung 6 :</u> | Autoradiogramme. Darstellung der Untergrunddiskriminierung.                                                                                                                                                          | 45 |
| <u>Abbildung 7 :</u> | Frequenzhistogramm.<br>Mess.-Nr. STA-1/89                                                                                                                                                                            | 48 |
| <u>Abbildung 8 :</u> | Frequenzhistogramme.<br>Mess.-Nr. STA-1/88, 91, 92, 95                                                                                                                                                               | 49 |
| <u>Abbildung 9 :</u> | Frequenzhistogramme.<br>Mess.-Nr. STA-1/39, 96, 97, 99                                                                                                                                                               | 49 |

|                       |                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Abbildung 1o :</u> | Frequenzhistogramme.<br>Mess.-Nr. STA-1/41, 44, 63, 66                                                                                                      | 49 |
| <u>Abbildung 11 :</u> | Frequenzhistogramme.<br>Mess.-Nr. STA-1/45, 68, 71, 1oo                                                                                                     | 49 |
| <u>Abbildung 12 :</u> | Frequenzhistogramme.<br>Mess.-Nr. STA-1/73, 76, 123, 128                                                                                                    | 5o |
| <u>Abbildung 13 :</u> | Frequenzhistogramme.<br>Mess.-Nr. STA-1/126 und 127                                                                                                         | 5o |
| <u>Abbildung 14 :</u> | Ausdrucke der im Autoradiogramm über<br>Scanning-Mikroabsorptionsphotometrie<br>erhobenen Einzelextinktionen. QUICKPRINT.<br>Mess.-Nr. STA-1/88, 97, 99, 39 | 52 |
| <u>Abbildung 15 :</u> | Ausdrucke (QUICKPRINT)<br>Mess.-Nr. STA-1/41, 44, 66, 68                                                                                                    | 53 |
| <u>Abbildung 16 :</u> | Ausdrucke (QUICKPRINT)<br>Mess.-Nr. STA-1/45, 71, 1oo                                                                                                       | 54 |
| <u>Abbildung 17 :</u> | Ausdrucke (QUICKPRINT)<br>Mess.-Nr. STA-1/73, 76, 123, 128                                                                                                  | 55 |
| <u>Abbildung 18 :</u> | Originalautoradiographien von NEN-<br>Standards nach 1, 2 u. 3 Tagen expo-<br>sitionszeit.                                                                  | 6o |
| <u>Abbildung 19 :</u> | Darstellung der manuellen Abgrenzung<br>von Einzelextinktionen im Gesamtaus-<br>druck (TELETYPE) der pro Meßfeld er-<br>hobenen Daten.                      | 62 |

- Abbildung 20 : Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit von NEN-Standards mit steigenden spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten. 65
- Abbildung 21 : Korrelation der mikro-absorptionsphotometrisch gemessenen  $\overline{O.D.}$  zur spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der Standards (DPM/mg). 67
- Abbildung 22 : Autoradiogramm eines Hirnschnittes von 100  $\mu\text{m}$  Schnittdicke nach 3 Tagen Expositionszeit gegenüber der Photoemulsion (auf 200% Originalgröße vergrößert). 71
- Abbildung 23 : Darstellung des vom PDP-12-Rechner erstellten Datenbildes aller im Meßbereich liegender Einzelextinktionen. 72
- Abbildung 24 : Histologisches Präparat eines Hirnschnittes nach stattgehabter Flächenstanzung. 200% Originalgröße. 79
- Abbildung 25 : Autoradiogramme eines Hirnschnittes vor und nach der Flächenstanzung. 200% Originalgröße. 80
- Abbildung 26 : Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte. Gesamtaktivität  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 100  $\mu\text{Ci}$  Expositionszeit: 1 Tag 95

- Abbildung 27 : Korrelation der mittleren Extinktion  
( $\overline{O.D.}$ ) zur Schnittdicke der autoradio-  
graphierten Hirnschnitte.  
Gesamtaktivität  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose: 100  $\mu\text{Ci}$   
Expositionszeit: 2 Tage 96
- Abbildung 28 : - idem - jedoch:  
Glukose : 100  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 3 Tage 96
- Abbildung 29 : - idem -  
Glukose : 75  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 1 Tag 97
- Abbildung 30 : - idem -  
Glukose : 75  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 2 Tage 98
- Abbildung 31 : - idem -  
Glukose : 75  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 3 Tage 98
- Abbildung 32 : - idem -  
Glukose : 50  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 1 Tag 99
- Abbildung 33 : - idem -  
Glukose : 50  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 2 Tage 99

Abbildung 34 : Korrelation der mittleren Extinktion  
(O.D.) zur Schnittdicke der autoradio-  
graphierten Hirnschnitte.

Glukose: 50  $\mu$ Ci  
Expo-Zeit: 3 Tage 100

Abbildung 35 : - idem -

Glukose: 25  $\mu$ Ci  
Expo-Zeit: 3 Tage 100

Abbildung 36 : Korrelation der mittleren Extinktion  
(O.D.) zur Expositionszeit der Auto-  
radiogramme (1, 2, 3 Tage).

Glukose: 100  $\mu$ Ci  
Schnittdicke: 50  $\mu$ m 102

Abbildung 37 : - idem -

Glukose : 100  $\mu$ Ci  
Schnittdicke : 100  $\mu$ m 102

Abbildung 38 : - idem -

Glukose : 75  $\mu$ Ci  
Schnittdicke : 50  $\mu$ m 103

Abbildung 39 : - idem -

Glukose : 75  $\mu$ Ci  
Schnittdicke : 75  $\mu$ m 103

- Abbildung 40 : Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zur Expositionszeit der Autoradiogramme (1, 2, 3 Tage).  
Glukose : 50  $\mu$ Ci  
Schnittdicke : 50  $\mu$ m 104
- Abbildung 41 : - idem -  
Glukose : 50  $\mu$ Ci  
Schnittdicke : 75  $\mu$ m 104
- Abbildung 42 : Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) zu der dem Tier applizierten Gesamtaktivität an  $^{14}\text{C}$ -D-Glukose (50, 75 und 100  $\mu$ Ci).  
Schnittdicke: 100  $\mu$ m  
Expo-Zeit : 1 Tag 106
- Abbildung 43 : - idem -  
Schnittdicke: 100  $\mu$ m  
Expo-Zeit : 2 Tage 107
- Abbildung 44 : - idem -  
Schnittdicke: 100  $\mu$ m  
Expo-Zeit : 3 Tage 107
- Abbildung 45 : Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Autoradiogramm zu der gewebsinkorporierten spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe. Expositionszeit: 1 Tag 114

- Abbildung 46 : Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) im Autoradiogramm zu der gewebsinkorporierten spezifischen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Hirngewebe. Expositionszeit: 3 Tage 115
- Abbildung 47 : Graphische Darstellung der Korrelation der mittleren Extinktion ( $\overline{O.D.}$ ) traumatisierter Hirnautoradiogramme zu der Schnittdicke der autoradiographierten Hirnschnitte.  
Glukose : 50  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 1 Tag 122
- Abbildung 48 : idem, jedoch  
Glukose : 100  $\mu\text{Ci}$   
Expo-Zeit : 3 Tage 123
- Abbildung 49 : idem, jedoch zur Expositionszeit:  
Glukose : 75  $\mu\text{Ci}$   
Schnittdicke: 50  $\mu\text{m}$  123
- Abbildung 50 : Autodiagramme von 4 Hirnschnitten verschiedener traumatisierter Hirngewebe (Hirnschnitt-Nummern 154 - 157) 124

VIII.    TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Stephan BONORDEN

- 27.12.1953                    geboren in Marburg an der Lahn.
- 1960 - 61                    Besuch der Volksschule in Marburg.
- 1961                        Umzug nach Düren (Rheinland).
- 1961 - 1964                Besuch der Volksschule in Düren.
- 1964 - 1972                Besuch des humanistischen Gymnasiums  
/ altsprachlicher Zweig    in Düren.
- 1972                        Abitur.
- 1972                        Aufnahme des Studiums der Humanmedizin  
an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- ab November 1974        Dissertation über das Thema:  
"Untersuchungen zur quantitativen Auto-  
radiographie des <sup>14</sup>C-D-Glukose-Stoff-  
wechsels von normalem und traumatisiertem  
Rattenhirn mit Hilfe der Mikro-Absorptions-  
Photometrie".
- ab Oktober 1978        Dissertation über das Thema:  
"Ernst Gottfried Baldinger - Ein Überblick  
über die Medizin und Zahnmedizin des aus-  
klingenden 18. Jahrhunderts anhand der  
Registratur der von E.G. Baldinger heraus-  
gegebenen Zeitung mit dem Titel: 'Altes und  
neues Magazin für Ärzte', Leipzig, 1777  
- 1798".

- Oktober 1978      Abschluß des Studiums der Humanmedizin  
und Erlangung der Approbation als Arzt.
- Oktober 1978      Aufnahme des Studiums der Zahnmedizin  
an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
mit dem Ziel der Erlangung einer Doppel-  
approbation als Grundlage für eine spä-  
tere Weiterbildung zum Facharzt für  
Zahn-, Mund- und Kieferchirurgie.
- April 1980      Fortsetzung des Studiums der Zahnmedizin  
an der Universität Bonn.



